Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. U. Trendelenburg

EINFLUSS DER EXTRAZELLULÄREN Na^+-KONZENTRATION AUF DIE WIRKUNG VERSCHIEDENER HEMMSTOFFE DES NEURONALEN MEMBRANTRANSPORTES VON NORADRENALIN

INAUGURAL - DISSERTATION

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Claus-Jürgen Zeitner

aus Miltenberg/Main

Würzburg, den 31. August 1982

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. U. Trendelenburg

EINFLUSS DER EXTRAZELLULÄREN Na^+- KONZENTRATION AUF DIE WIRKUNG VERSCHIEDENER HEMMSTOFFE DES NEURONALEN MEMBRANTRANSPORTES VON NORADRENALIN

INAUGURAL - DISSERTATION

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Claus-Jürgen Zeitner

aus Miltenberg/Main

Würzburg, den 31. August 1982

Referent : Priv.-Doz. Dr. med. Karl-Heinz GRAEFE

Korreferent : Professor Dr. med. U. TRENDELENBURG

Dekan : Professor Dr. med. K.-A. BUSHE

Tag der mündlichen Prüfung: 19.11.1982

UNIV. LEIDEN BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg

Meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543522_0052

INHALTSVERZEICHNIS

			Seite
A)	EINLEITUNG		3
B)	METHODEN		5
	1.	Vorbehandlung der Tiere	5
	2.	Präparation des Gewebes	6
	3.	Lösungen	7
	4.	Versuchsprotokoll	7
		a) Influx-Versuche mit verschiedenen Noradrenalin-Konzentrationen (Na^+-Konzentration 25 oder 140 mM)	7
		b) Influx-Versuche mit konstanter Noradrenalin-Konzentration (Na^+-Konzentration zwischen 10 und 140 mM)	9
		c) Efflux-Versuche	9
	5.	Bestimmung der Radioaktivität	11
	6.	Mathematische und statistische Auswertung der Versuche	11
	7.	Substanzen	14
C)	ERGEBNISSE		15
I.	Aufnahme-Versuche		15
	1.	Cocainresistente Aufnahme	15
		1.1 Cocainresistente Aufnahme in Abwesenheit von Hemmstoffen der neuronalen Aufnahme	15
		1.2 Cocainresistente Aufnahme in Anwesenheit von Hemmstoffen der neuronalen Aufnahme	17

Seite

2. Einfluß von Na^+ auf die inhibitorische Wirkung von Cocain 18

3. Einfluß von Na^+ auf die inhibitorische Wirkung von (-)Metaraminol 22

4. Einfluß von Na^+ auf die inhibitorische Wirkung von (+) Amphetamin 26

5. Einfluß von Na^+ auf die inhibitorische Wirkung von Nomifensin 30

6. Einfluß von Na^+ auf die inhibitorische Wirkung von Desipramin 33

II. Efflux-Versuche 39

1. Einfluß von Cocain auf den neuronalen Efflux von ^{3}H-Noradrenalin 40

2. Einfluß von Nomifensin auf den neuronalen Efflux von ^{3}H-Noradrenalin 44

3. Einfluß von (+)Amphetamin auf den neuronalen Efflux von ^{3}H-Noradrenalin 46

4. Einfluß von (-)Metaraminol auf den neuronalen Efflux von ^{3}H-Noradrenalin 48

D) DISKUSSION 50

E) ZUSAMMENFASSUNG 58

F) LITERATURVERZEICHNIS 62

A) EINLEITUNG

Zahlreiche Autoren haben gezeigt, daß die Aufnahme von Noradrenalin durch adrenerge Nervenendigungen Na^+-abhängig ist. Die ersten, denen dies gelang, waren Iversen und Kravitz (1966) sowie Bogdanski und Brodie (1966). Seither ist die Rolle, die Na^+ im neuronalen Noradrenalin-Aufnahmemechanismus spielt, Gegenstand weitreichender Forschung (Bogdanski et al., 1968; 1970; Horst et al., 1968; Bogdanski und Brodie, 1969; Sugrue und Shore, 1969; Harris und Baldessarini, 1973; Holz und Coyle, 1974; White, 1976; Sánchez-Armáss und Orrego, 1978; Keller und Graefe, 1979; Sammet und Graefe, 1979). Die Notwendigkeit von Na^+ für die Aufnahme von Noradrenalin scheint absolut zu sein (Keller und Graefe, 1979). Nach Sammet und Graefe (1979) hat der neuronale Aufnahmemechanismus für Noradrenalin die kinetischen Eigenschaften einer Bi-Substratreaktion, in der sich Noradrenalin und Na^+ im Verhältnis 1:1 an den Carrier binden müssen, damit Noradrenalin transportiert wird. Na^+ fungiert also als Co-Substrat des Noradrenalins bei dessen neuronaler Aufnahme.

Einen entscheidenden Beitrag zur genaueren Analyse der Noradrenalin-Aufnahmemechanismen lieferte die Entdeckung spezifischer Hemmstoffe sowohl der neuronalen, wie auch der extraneuronalen (Iversen, 1965) Aufnahme. Während Corticosteroide relativ spezifisch die extraneuronale Aufnahme hemmen (Iversen und Salt, 1970), gehört in die Gruppe der Hemmstoffe der neuronalen Noradrenalin-Aufnahme als wohl bekanntester Vertreter das Cocain (Muscholl, 1961; Iversen 1963; Berti und Shore, 1967; Maxwell et al., 1970; Graefe et al., 1978).

Weitere Vertreter dieser Gruppe sind die Phenyläthylamine (Burgen und Iversen, 1965; Muscholl und Weber, 1965; Horn et al., 1971; Horn, 1973), die trizyklischen Antidepressiva wie Desipramin und Nortriptylin und andere verwandte Substanzen wie z. B. Nomifensin (Maxwell et al., 1969; Maxwell und White, 1978; Iversen und Mackay, 1979; Schacht und Heptner, 1974).

Durch Untersuchung ausgewählter Hemmstoffe soll in der vorliegenden Arbeit die Frage geklärt werden, ob entsprechend der Na^+-Abhängigkeit der neuronalen Noradrenalin-Aufnahme auch eine Na^+-Abhängigkeit der inhibitorischen Wirkung der Hemmstoffe existiert.

B) METHODEN

1. VORBEHANDLUNG DER TIERE

Männliche Albino-Wistar-Ratten mit einem Gewicht zwischen 200 und 400 g (im Durchschnitt etwa 250 g) erhielten 20 bis 24 h vor dem Versuch 5 mg/kg und 2 bis 3 h vor dem Versuch 2,5 mg/kg Körpergewicht Reserpin s.c. injiziert. Durch die Vorbehandlung mit Reserpin wurden die endogenen Norardenalin-Speicher entleert und ferner verhindert, daß exogenes Noradrenalin in die Speichervesikel aufgenommen werden konnte.

Der Abbau extravesikalen Noradrenalins durch die Monoaminoxidase wurde durch s.c. Injektion von 100 mg/kg Paryglin 2 bis 3 h vor Versuchsbeginn verhindert, derjenige durch Catechol-O-Methyltransferase mit Hilfe von 3', 4'-Dihydroxy-2-methylpropiophenon (U-0521; Giles und Miller, 1967), das beim Ansetzen der Inkubationslösungen diesen zugegeben wurde und sich somit während des ganzen Versuches im Inkubationsmedium befand (0,1 mM).

Reserpin (Serpasil^{R}) wurde nicht länger als vier Wochen in Form einer Stammlösung (10 mg/ml 20 %-ige Ascorbinsäure) im Kühlschrank aufbewahrt. Pargylin wurde vor jedem Versuch frisch in aqua bidest. gelöst (200 mg/ml).

2. PRÄPARATION DES GEWEBES

Nach Betäubung durch einen Schlag auf den Kopf wurden die Ratten durch Dislokation der Halswirbelsäule getötet. Nach Eröffnung des Abdomens der Tiere wurden die Samenleiter zunächst weitgehend von anliegender Serosa, Adventitia, von Nerven und Bindegewebe befreit. Die Mittelstücke der Samenleiter wurden in situ in einer Länge von ungefähr 10 mm längs gespalten, herausgeschnitten und dann nach Abziehen der Mucosa nochmals längs halbiert. Das Ziel dieser Präparationsmethode war es, aus beiden Samenleitern der Ratte nahezu gleichgewichtige Gewebsproben zu erhalten. In den Versuchen wurde der Mittelteil der Samenleiter verwendet, da nur hier über eine gewisse Strecke der endogene Noradrenalin-Gehalt, d.h. die Dichte der adrenergen Innervation konstant ist, während dagegen insgesamt der Gehalt an endogenem Noradrenalin vom epididymalen zum prostatischen Ende stark zunimmt (Zieher und Jaim-Etcheverry, 1971). Nach der Präparation wurden die Gewebsstückchen zwischen Filterpapier getrocknet und sofort gewogen; das mittlere Gewicht betrug 10 mg. Daran anschließend wurden sie frei beweglich an Plastikstäbchen durch Fäden befestigt und dann wieder in eine mit reinem O_2 durchperlte Inkubationslösung gebracht, in der sie sich auch während der Präparation befunden hatten. In dieser Lösung blieben die Gewebsproben bis zum Beginn der Inkubation. Für die Influx-Versuche wurde an einem Plastikstäbchen je eine Hälfte eines präparierten Samenleiters befestigt, wogegen bei den Efflux-Versuchen an ein Stäbchen alle vier Samenleiterhälften eines Tieres angebunden wurden.

3. LÖSUNGEN

Die verwendete Inkubationslösung wurde für jeden Versuch frisch angesetzt. Sie hatte die folgende Zusammensetzung ($mmol^{-1}$): NaCl (140), KCl (5, 0), $CaCl_2$ (2, 5), TrisHCl (10, 0), Glucose (10, 1), Na_2EDTA (0,004), Na-Ascorbat (0, 1), (Na_2EDTA und Na-Ascorbat zum Schutz des Noradrenalins vor Autoxidation), und 3', 4'- Dihydroxy-2-methylpropiophenon (0, 1) (um die Catechol-O-Methyltransferase zu hemmen; Giles und Miller, 1967). Das Medium wurde während des ganzen Versuchs von reinem O_2 durchperlt. Die Konzentration von Na^+ im Medium wurde dadurch geändert, daß NaCl isosmolar durch TrisHCl ersetzt wurde. Der pH-Wert der Lösung war 7, 4.

4. VERSUCHSPROTOKOLL

a) Influx-Versuche mit verschiedenen Noradrenalin-Konzentrationen (Na^+-Konzentration 25 oder 140 mM)

Die Inkubation der Samenleiter erfolgte bei 37° C in Zentrifugenröhrchen, die 2 ml Inkubationsmedium enthielten. Vom Boden des Röhrchens aus wurde das Medium während des ganzen Versuchs von reinem O_2 durchperlt.

In der ersten Vorinkubationsphase (20 min) wurde die eine Hälfte des Samenleiters in einer Lösung mit 140 mM Na^+ inkubiert, während die Inkubationslösung für die andere Hälfte 140 mM Na^+ und 100 µM Cocain enthielt. Die Vorinkuabtion mit 140 mM Na^+ hatte den Zweck, eventuell vorhandene Na^+-Unterschiede in den Geweben auszugleichen. Während des ganzen folgenden Versuchsablaufes wurde diese Anordnung beibehalten: das Inkubationsmedium der einen Samenleiterhälfte

enthielt kein Cocain, das der anderen 100 µM Cocain (zur Hemmung der neuronalen Aufnahme von Noradrenalin).

Auf die erste Vorinkubationsphase folgte eine vierminütige zweite Vorinkubationsphase, während der die Samenleiter in ein Medium folgender Zusammensetzung eingebracht wurden: die Na^+-Konzentration im Medium betrug in der einen Versuchsreihe 140 mM und in der anderen 25 mM (115 mM NaCl wurden isosmolar durch TrisHCl ersetzt). Die zweite Vorinkubation verlief entweder unter Kontrollbedingungen oder unter Bedingungen, in denen das Medium zusätzlich einen der folgenden Hemmstoffe der neuronalen Aufnahme enthielt: Cocain (1,5 µM), Nomifensin (0,1 µM), (-)Metaraminol (1,0 µM), (+) Amphetamin (0,2 oder 1,0 µM), Desipramin (0,1 oder 0,02 µM).

Nach dieser zweiten Vorinkubation wurden die Samenleiterhälften zwischen Filterpapier abgetupft und dann sofort für 1 min in eine andere Inkubationslösung überführt. Diese hatte die gleiche Zusammensetzung wie das Medium der zweiten Vorinkubation; sie enthielt aber zusätzlich 5 µl eines Noradrenalin-Standards (verschiedene Konzentrationen) und 2 µl ^{3}H-Noradrenalin (spezifische Aktivität = 2,83 Ci/mMol; dies entspricht einer Endkonzentration an "heißem" Noradrenalin von 0,18 µM). Die sich daraus ergebende totale Noradrenalin-Konzentration (markiertes + nicht markiertes Noradrenalin) lag zwischen 1,0 und 12,2 µM. Sofort nach Beendigung der Inkubation wurde die zelluläre Noradrenalin-Aufnahme dadurch gestoppt, daß die Gewebsproben für 20 s in 4 ml eiskalter aminfreier Lösung (140 mM Na^+) abgespült wurden.

Die Gewebe wurden anschließend zwischen zwei Blättchen Filterpapier kräftig getrocknet, in Zählfläschchen mit 2 ml 0,01 N HCl überführt und extrahiert. Die Radioaktivität der Gewebsproben und von Teilvolumina des Inkubationsmediums (100 µl) wurde mittels Flüssigkeitsscintillationsmessung bestimmt.

b) Influx-Versuche mit konstanter Noradrenalin-Konzentration
(Na^+-Konzentration zwischen 10 und 140 mM)

Zur Bestimmung des Einflusses der Na^+-Konzentration auf die Hemmwirkung der verschiedenen Antagonisten der neuronalen Noradrenalin-Aufnahme wurde folgendes an der Zusammensetzung der Inkubationslösung geändert: bei unveränderter erster Vorinkubation wurde während der zweiten Vorinkubation die Na^+-Konzentration im Medium zwischen 10 und 140 mM variiert. Die Osmolarität wurde in Na^+-armen Lösungen durch TrisHCl aufrecht erhalten (NaCl wurde isosmolar durch TrisHCl ersetzt). Die Versuche wurden entweder in Abwesenheit oder in Anwesenheit von Cocain (2 µM), (-)Metaraminol (2 µM), (+)Amphetamin (1 µM), Nomifensin (0,1 µM) oder Desipramin (0,04 oder 0,1 µM) durchgeführt.

Die ^{3}H-Noradrenalin-Konzentration im Inkubationsmedium betrug immer 1,18 µM, d.h. Zugabe von 5 µM des Noradrenalin-Standards (400 nMol/ml 0,01 N HCl, entsprechend einer Endkonzentration von 1,0 µM) und 2 µl des ^{3}H-Noradrenalins (spezifische Aktivität = 2,83 Ci/mMol, entsprechend einer Endkonzentration des "heißen" Noradrenalins von 0,18 µM) zur Inkubationslösung.

Der Versuchsaufbau glich dem der unter a) beschriebenen Influx-Versuche.

c) Efflux-Versuche

Beide Vasa deferentia eines Tieres wurden an einem Plastikstäbchen befestigt und in Zentrifugenröhrchen eingebracht, die 2 ml Medium von 37° C enthielten. Während des ganzen Versuches wurde das Medium von reinem O_2 durchperlt.

Ebenso wie in den Influx-Versuchen wurden die Samenleiter zunächst in einer aminfreien Lösung (140 mM Na^+) für 20 min vorinkubiert, um eventuell vorhandene Na^+-Unterschiede in den Geweben auszugleichen.

Es folgte eine 30-minütige Inkubationsphase in 2 ml Lösung, die Na^+ in einer Konzentration von 140 mM und Noradrenalin (markiert und nicht markiert) in einer Konzentration von insgesamt 0,97 µM enthielt (zur Inkubationslösung wurden 3 µl ^{3}H-Noradrenalin der spezifischen Aktivität von 2,83 Ci/mMol entsprechend einer Endkonzentration von 0,27 µM und 3,5 µl des Noradrenalin-Standards von 400 nMol/ml entsprechend einer Endkonzentration von 0,70 µM zugegeben). Aus dieser Lösung wurden nach dem Ende der Inkubation je 50 µl in zwei counting vials zur späteren Auszählung überführt.

Nach Beendigung der Inkubation mit ^{3}H-Noradrenalin wurden die Gewebe zwischen zwei Streifen Filterpapier flüchtig abgetrocknet und dann in aminfreiem Medium ausgewaschen. Die Auswachsphase, die der Bestimmung des ^{3}H-Noradrenalin-Efflux aus dem Gewebe diente, hatte eine Dauer von 115 min. Während der ersten 100 min enthielt das Auswaschmedium grundsätzlich 140 mM Na^+ und wurde zunächst alle 10 min (70 min lang), dann alle 2 min (14 min lang) und zuletzt jede Minute (16 min lang) erneuert. Während der sich daran anschließenden 15 letzten Minuten des Versuchs wurde das Auschwaschmedium wieder jede Minute erneuert und enthielt entweder 140 oder 0 mM Na^+, sowie in einigen Versuchen einen der folgenden Hemmstoffe der neuronalen ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahme: Cocain (2 µM), Nomifensin (0,1 µM), (+)Amphetamin (0,5 µM) oder (-)Metaraminol (1,5 µM). Zur Bestimmung der aus dem Gewebe abgegebenen Radioaktivität wurde aus allen Bädern, in denen sich das Gewebe nur eine Minute befunden hatte, 1 ml in Zählfläschchen überführt. Die Gewebe selbst wurden zwischen zwei Blättchen Filterpapier getrocknet und in Zählfläschchen, die 2 ml 0,01 N HCl enthielten, extrahiert. Die in ihnen enthaltene Radioaktivität und die Radioaktivität der Teilvolumina der Inkubations- und Auswasch-

bäder wurden mittels Flüssigkeitsscintillationsmessung bestimmt.

5. BESTIMMUNG DER RADIOAKTIVITÄT

Der Gehalt der Proben an ^{3}H-Noradrenalin wurde mit Hilfe eines TRI-CARB-Flüssigkeitsscintillationszählers, Modell 3390/544 der Fa. Packard bestimmt.

Die aufgelösten Gewebsproben der Influx- und Efflux-Versuche wurden mit 12 ml, die Teilvolumina der Inkubationsbäder der Influx-Versuche mit 8 ml, die der Efflux-Versuche mit 10 ml eines Scintillatorcocktails der folgenden Zusammensetzung vermischt: 600 ml Toluol, 300 ml Triton X-100, 100 ml Äthanol (98 %), 20 ml 1 N HCl, 5 g 2, 5-Diphenyl-oxazol (PPO), 0, 1 g Dimethyl-1, 4-bis-2-(4-methyl-5- phenyloxazolyl)-Benzol (Dimethyl-POPOP) (Graefe et al., 1973).

Die im ^{3}H-Kanal gezählten Zerfälle/min (cpm) wurden auf absolute Zerfälle/min (dpm) hochgerechnet, mittels der Formel dpm = cpm/ efficiency. Die Zählausbeute für ^{3}H betrug ungefähr 24 %.

6. MATHEMATISCHE UND STATISTISCHE AUSWERTUNG DER VERSUCHE

Die für den Text und die Abbildungen verwendeten Werte sind arithmetische Mittel ($\bar{x}$) mit dem mittleren Fehler des Mittelwertes ($S_{\bar{x}}$) als Streuung. n gibt die Anzahl der Versuche wieder. Die Signifikanz des Unterschiedes zwischen den errechneten Mittelwerten wurde mit Hilfe des t-Tests (nach Student) überprüft. Ein signifikanter Unterschied war dann gegeben, wenn $P < 0,05$ war. In den graphischen Darstel-

lungen der Kurven wurden signifikante Unterschiede mit den dazu gehörigen P-Werten durch * gekennzeichnet. Regressionsanalysen wurden nach den üblichen statistischen Methoden berechnet (Snedecor und Cochran, 1967).

Die Aufnahme von ^{3}H-Noradrenalin ins Gewebe wurde bestimmt, indem die eine Hälfte des Samenleiters in Gegenwart, die andere in Abwesenheit von 100 µM Cocain (zur Hemmung der neuronalen Aufnahme) inkubiert wurde. Aus der Differenz der ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahmen beider Samenleiterhälften ergab sich die neuronale ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahme. Bei dieser Bestimmungsmethode konnte die extraneuronale Verteilung, die zu 70 % aus extrazellulärer Noradrenalin-Verteilung besteht (Sammet und Graefe, 1979) unberücksichtigt bleiben. Diese wird durch Cocain (100 µM) nicht beeinflußt, so daß durch Subtraktion der cocainresistenten Aufnahme von der Gesamtaufnahme, auch ohne Korrektur der Meßgrößen mit dem Extrazellulärraum, die neuronale Aufnahme von ^{3}H-Noradrenalin berechnet werden konnte.

Die Sättigungsfunktionen, die die initiale, neuronale ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahme in Abhängigkeit von der Noradrenalin- oder Na^{+}-Konzentration im Inkubationsmedium beschreiben, wurden durch lineare Regressionsanalyse bestimmt. Dazu wurde die Michaelis-Menten-Gleichung

$$v = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S}$$

(v = initiale ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahmerate in nMol $\cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$; S = Konzentration von ^{3}H-Noradrenalin oder Na^{+} im Inkubationsmedium in µM oder mM; V_{max} = maximale Aufnahmegeschwindigkeit in nMol $\cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$; K_m = Halbsättigungskonstante in µM, d.h. die Konzentration, bei der $v = V_{max}/2$) in die Form

$$1/v = 1/V_{max} + K_m/V_{max} \cdot 1/S$$

gebracht, die es erlaubt, diese Gleichung als Gerade

$$y = a + b \cdot x$$

darzustellen (mit $y = 1/v$; $x = 1/S$; Steigung = $b = K_m/V_{max}$; Abszissenabschnitt = $-1/K_m$; Ordinatenabschnitt = $a = 1/V_{max}$). Diese Methode wurde von Lineweaver und Burk (1934) beschrieben. Durch Minimalisierung der quadratischen Abweichung wurden die Daten der Sättigungskurve an diese Gerade angepaßt.

Zum direkten Vergleich der Stärke der kompetitiven Hemmwirkung verschiedener Stoffe auf die neuronale ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahme bei einer Na^+-Konzentration von 140 bzw. 25 mM im Inkubationsmedium wurde der K_i-Wert dieser Hemmstoffe berechnet. Dazu wurde die folgende Formel verwendet:

$$K_i = \frac{K_m \cdot I}{K_m' - K_m}$$

(wobei: K_m = Halbstättigungskonstante in µM, d.h. die Konzentration von S, bei der $v = V_{max}/2$, in Abwesenheit eines Hemmstoffes; I = Inhibitorkonzentration in µM; K_m' = Halbsättigungskonstante in Gegenwart eines Hemmstoffes in µM).

Der Einfluß der Na^+-Konzentration auf die Hemmwirkung verschiedener Substanzen auf die neuronale Aufnahme von ^{3}H-Noradrenalin wurde durch Berechnung der Aufnahmehemmung bei verschiedenen Na^+-Konzentrationen dargestellt.

Die Aufnahmehemmung in % ergab sich aus den Mittelwerten der Kontrollgruppe und denen der jeweiligen Hemmstoffgruppe nach der Formel:

$$\% \text{ Hemmung} = 100 \cdot \left(1 - \frac{v \text{ Hemmstoff}}{v \text{ Kontrolle}}\right)$$

(v Hemmstoff = initiale neuronale ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahmerate in Anwesenheit der Hemmsubstanz und v Kontrolle = initiale Aufnahmerate in Abwesenheit der Hemmsubstanz).

In den Efflux-Versuchen wurde die aus dem Gewebe abgegebene Radioaktivität als FRL (fractional rate of loss) in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Die FRL ergab sich für jedes Auswaschintervall, indem die in jeder min aus dem Gewebe abgegebene Menge an Tritium als Bruchteil der Menge an ^{3}H-Noradrenalin ausgedrückt wurde, die sich zu diesem Zeitpunkt noch im Gewebe befand:

$$\text{FRL} = \frac{\text{Efflux-Geschwindigkeit von Tritium (t)}}{^3\text{H-Noradrenalin-Gehalt des Gewebes (t)}}$$

Die FRL hat die Dimension min^{-1}.

7. SUBSTANZEN

(+) Amphetamin-Sulfat (Sigma GMBH, München); Cocain-hydrochlorid (Fa. E. Merck, Darmstadt); 3′, 4′-Dihydroxy-2-methylpropiophenon (U-0521, Upjohn Company); Desipramin-hydrochlorid (Ciba-Geigy GMBH); D(-)Noradrenalin (Farbwerke Hoechst AG); ^{3}H-Noradrenalin (2, 83 Ci/mMol, NEN Chemicals); (-)Metaraminol (Sharp & Dohme GMBH, München); Nomifensin (Farbwercke Hoechst AG); Pargylin-hydrochlorid (Fa. Abbot, Belgien); Reserpin (Serpasil^R, Sigma Chemical Company, St. Louis).

Alle verwendeten Chemikalien wiesen einen "pro-analysi"-Reinheitsgrad auf.

C) ERGEBNISSE

I. AUFNAHME - VERSUCHE

1. COCAINRESISTENTE AUFNAHME

1.1 Cocainresistente Aufnahme in Abwesenheit von Hemmstoffen der neuronalen Aufnahme

Die cocainresistente Aufnahme von ^{3}H-Noradrenalin (d.h. die Summe aus extraneuronaler ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahme und ^{3}H-Noradrenalin-Verteilung in den Extrazellulärraum) wurde für verschiedene ^{3}H-Noradrenalin-Konzentrationen (1,0 -12,2 µM) sowohl bei einer Na^+-Konzentration von 140 mM, als auch bei einer Na^+-Konzentration von 25 mM bestimmt. Wie Abb. 1 zeigt, ergab sich folgendes:

1. Sowohl bei 140, als auch bei 25 mM Na^+ im Inkubationsmedium bestand eine lineare Abhängigkeit der cocainresistenten Aufnahme von der ^{3}H-Noradrenalin-Konzentration, d.h. die cocainresistente Aufnahme war in dem gewählten Konzentrationsbereich nicht sättigungsfähig.

2. Ein statistischer Vergleich der entsprechenden Punktepaare beider Geraden ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Ergebnissen der Versuche mit 140 mM Na^+ und denen mit 25 mM Na^+ ($P > 0,20$ bis $P > 0,80$). Dies zeigt, daß die cocainresistente Aufnahme weitgehend unabhängig von der im Inkubationsmedium vorhandenen Na^+-Konzentration war.

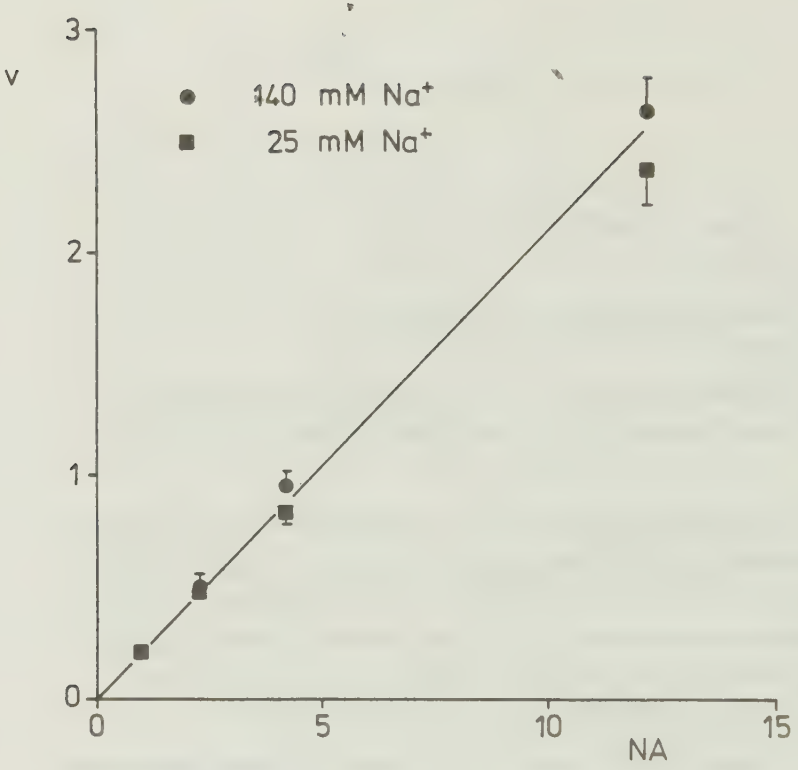

Abb. 1: Cocainresistente Aufnahme von ^{3}H-Noradrenalin am Ductus deferens der Ratte. Ordinate: v = initiale ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahmerate in nmol · g^{-1} . min^{-1}. Abszisse: NA = ^{3}H-Noradrenalin-Konzentration im Inkubationsmedium in µM. Halbierte Ductus deferentes von mit Reserpin vorbehandelten Ratten (Monoaminoxidase und Catechol-O-Methyltransferase gehemmt) wurden bei 37° C 1 min lang mit 100 µM Cocain und verschiedenen ^{3}H-Noradrenalin-Konzentrationen inkubiert (1,0 - 12,2 µM). Die Na^{+}-Konzentration im Inkubationsbad betrug 140 mM oder 25 mM (115 mM NaCl wurden isosmolar durch TrisHCl ersetzt). Gezeigt sind Mittelwerte ($\pm$ $S_{\bar{x}}$) aus mindestens neun Versuchen.

1.2 Cocainresistente Aufnahme in Anwesenheit von Hemmstoffen der neuronalen Aufnahme

Es sollte auch der Frage nachgegangen werden, ob die Anwesenheit von Hemmstoffen der neuronalen ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahme im Inkubationsmedium irgendeinen Einfluß auf die cocainresistente Aufnahme hat. Bei einem statistischen Vergleich der Versuchsergebnisse konnte bei keinem der verwendeten Hemmstoffe ((-)Metaraminol, Cocain, Nomifensin, (+) Amphetamin, Desipramin) ein signifikanter Unterschied zwischen der cocainresistenten Aufnahme bei 140 mM Na^+ und der bei 25 mM Na^+ festgestellt werden. Immer ergab sich eine lineare Abhängigkeit der cocainresistenten Aufnahme von der ^{3}H-Noradrenalin-Konzentration, d.h. auch hier war die cocainresistente Aufnahme nicht sättigungsfähig. Auch ein Vergleich der entsprechenden Punktepaare auf den Geraden (cocainresistente Aufnahme als Funktion der ^{3}H-Noradrenalin-Konzentration) für die einzelnen Hemmstoffe untereinander ergab keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,60$ bis $P > 0,80$).

Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, daß sich Veränderungen in der Gesamtaufnahme von ^{3}H-Noradrenalin in das Gewebe bei Anwesenheit verschiedener Hemmstoffe und verschiedener Na^+-Konzentrationen im Inkubationsmedium nur durch Veränderungen in der neuronalen Aufnahme erklären lassen, da sich die Gesamtaufnahme aus neuronaler Aufnahme und cocainresistenter Aufnahme zusammensetzt (s. Methodik, s. auch Sammet und Graefe, 1979).

Im folgenden soll nur noch von dieser neuronalen Aufnahme die Rede sein. Es soll festgestellt werden, welchen Einfluß verschiedene Na^+-Konzentrationen auf die inhibitorische Wirkung verschiedener Hemmstoffe haben.

2. EINFLUSS VON Na^+ AUF DIE INHIBITORISCHE WIRKUNG VON COCAIN

Bei den folgenden Versuchen wurde ^{3}H-Noradrenalin in vier verschiedenen Konzentrationen verwendet, nämlich 1,0/2,2/4,2 und 12,2 µM. Aus früheren Veröffentlichungen (Übersichten bei Iversen 1967, 1975) ist bekannt, daß der K_m-Wert für Noradrenalin in verschiedenen Geweben der Ratte im Bereich von 0,40 bis 1,60 µM liegt. Iversen gibt den K_m-Wert für Noradrenalin am Vas deferens der Ratte mit 1,90 µM an. Die erste der gewählten ^{3}H-Noradrenalin-Konzentrationen war etwa halb so hoch wie der K_m-Wert, die zweite lag im Bereich des K_m-Wertes, und die beiden anderen waren ungefähr doppelt, bzw. siebenmal so hoch. Unter der Voraussetzung, daß die neuronale ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahme der Michaelis-Menten-Kinetik (s. Methodik) gehorcht, wurde diese daher bei ungefähr halb-maximaler und annähernd maximaler Geschwindigkeit untersucht.

Der erste in der Reihe der Hemmstoffe der neuronalen ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahme, die im folgenden dargestellt und besprochen werden sollen, ist Cocain - wohl der bekannteste Vertreter aus dieser Gruppe.

Aus Abb. 2 a und b ist ersichtlich, daß sich bei Auftragung der gewonnenen Daten nach Lineweaver und Burk (1934), nämlich $1/v$ gegen $1/NA$ (s. Methodik), sowohl bei 140 mM Na^+ als auch bei 25 mM Na^+ im Inkubationsmedium Geraden ergaben, d. h. daß die Ergebnisse der Michaelis-Menten-Kinetik gehorchten. Cocain als Hemmstoff der neuronalen ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahme veränderte nur die Steigung der Geraden (s. Abb. 2a und b), nicht aber den Schnittpunkt mit der Ordinate. Dies ist kennzeichnend für einen kompetitiven Hemmstoff (Segel, 1975); ohne Änderung der V_{max} ($1/V_{max}$ = konstant) wurde die Steigung der Geraden im Lineweaver-Burk-Plot erhöht, der scheinbare K_m (K_m') nahm zu. Bei Anwesenheit von 140 mM Na^+ verdoppelte er sich, bei Anwesenheit von 25 mM Na^+ versechsfachte er sich gegenüber der Kontrolle.

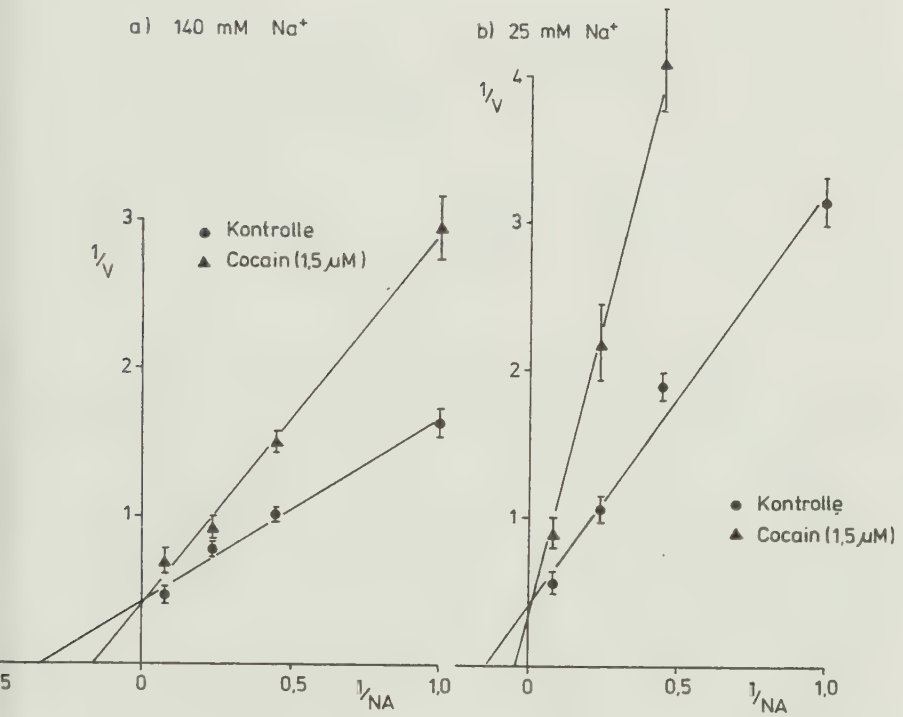

Abb. 2a und b: Lineweaver-Burk Analyse der Hemmwirkung von Cocain auf die neuronale ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahme; Ductus deferens der Ratte. Ordinaten: 1/v (v = initiale neuronale ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahmerate in nMol· g^{-1} · min^{-1}). Abszissen: 1/NA (NA = Konzentration von ^{3}H-Noradrenalin im Inkubationsmedium in µM). Halbierte Ductus deferentes von mit Reserpin vorbehandelten Ratten (Monoaminoxidase und Catechol-O-Methyltransferase gehemmt) wurden bei 37° C 1 min lang mit verschiedenen ^{3}H-Noradrenalin-Konzentrationen (1, 0 - 12, 2 µM) inkubiert. Die eine Hälfte des Samenleiters wurde in Abwesenheit, die andere in Anwesenheit von 100 µM Cocain (zur Hemmung der neuronalen Aufnahme) inkubiert. Aus der Differenz der ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahmen beider Samenleiterhälften ergab sich die neuronale Aufnahme. Die Na^+-Konzentration im Inkubationsmedium betrug 140 mM (Abb. 2a) oder 25 mM (Abb. 2b; 115 mM NaCl wurden isosmolar durch TrisHCl ersetzt). Die ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahme wurde entweder unter Kontrollbedingungen oder in Gegenwart von 1, 5 µM Cocain gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte ($\pm S_x$) aus mindestens sechs Versuchen. Die Geraden wurden durch Regressionsanalyse bestimmt.

Um die Hemmwirkung von Cocain bei 140 mM Na^+ mit der bei 25 mM Na^+ vergleichen zu können, wurde der K_i-Wert für Cocain bei beiden Na^+-Konzentrationen nach der in der Methodik angegebenen Formel berechnet. Die Werte, die Abb. 2a und b zugrunde liegen, ergaben bei Anwesenheit von 140 mM Na^+ im Medium einen K_i-Wert von 1,3 µM, während bei Anwesenheit von 25 mM Na^+ ein Wert von 0,28 µM gefunden wurde. Anhand dieser Werte zeigt sich, daß die Hemmwirkung von Cocain bei zunehmender Na^+-Konzentration abnimmt.

Zur weiteren Klärung der Na^+-Abhängigkeit des Cocain-Effektes wurde, wie Abb. 3 a zeigt, bei konstanter ^{3}H-Noradrenalin-Konzentration (1,18 µM) die neuronale Aufnahme bei verschiedenen Na^+-Konzentrationen (10 bis 140 mM) bestimmt. Es ergab sich, daß die neuronale ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahme in Abwesenheit und in Anwesenheit von Cocain auch in Abhängigkeit von der Na^+-Konzentration der Michaelis-Menten-Kinetik gehorchte. Die Verwendung der Lineweaver-Burk-Darstellung ($1/v$ gegen $1/Na^+$) ergab Geraden. Beide Geraden hatten einen gemeinsamen Schnittpunkt auf der Ordinate. Diese Beobachtung zeigt, daß erstens die neuronale Aufnahme von ^{3}H-Noradrenalin bei konstanter Aminkonzentration mit steigender Na^+-Konzentration gesättigt werden kann, und daß zweitens sich Cocain auch gegenüber Na^+ als kompetitiver Hemmstoff erweist, d.h. der Hemmeffekt von Cocain mit steigender Na^+-Konzentration abnimmt.

Der Einfluß der Na^+-Konzentration auf die Hemmwirkung von Cocain ergab sich auch durch die Berechnung der %-Aufnahmehemmung bei verschiedenen Na^+-Konzentrationen nach der Formel:

$$\% \text{ Hemmung} = 100 \cdot \left(1 - \frac{v \text{ Cocain}}{v \text{ Kontrolle}}\right).$$

In der Formel wurden Mittelwerte der Kontroll- und Cocain-Gruppe verwendet. Die Ergebnisse sind in Abb. 3b dargestellt. Die Hemmwirkung von Cocain nahm danach mit steigender Na^+-Konzentration ab.

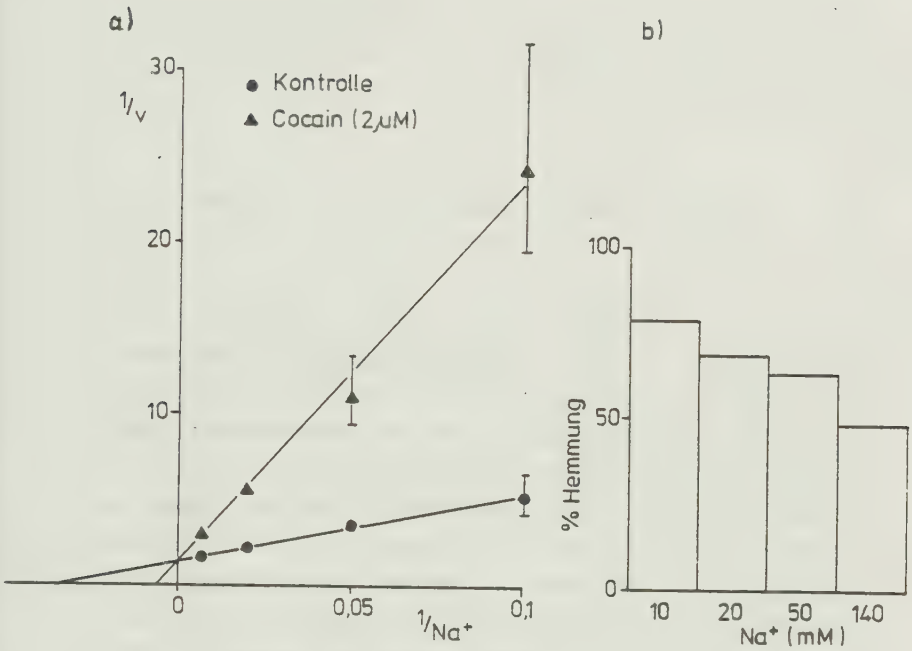

Abb. 3a und b: Einfluß der Na^+-Konzentration auf die Hemmwirkung von Cocain auf die neuronale ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahme; Ductus deferens der Ratte. Ordinaten: a: $1/v$ (v = initiale neuronale ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahmerate in nMol $\cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$). b: Aufnahmehemmung durch Cocain in %. Abszissen: a: $1/Na^+$ (Na^+ = Na^+-Konzentration im Inkubationsmedium in mM). b: Na^+. Die experimentellen Bedingungen und die Methode zur Bestimmung der initialen ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahmerate sind in der Legende zur Abb. 2 beschrieben. Die ^{3}H-Noradrenalin-Konzentration betrug 1,18 µM, die Na^+-Konzentration im Inkubationsmedium lag zwischen 10 und 140 mM. Die Osmolarität wurde in Na^+-armen Lösungen durch TrisHCl (NaCl isosmolar durch TrisHCl ersetzt) aufrecht erhalten. Die Versuche wurden entweder unter Kontrollbedingungen oder in Gegenwart von 2 µM Cocain durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte ($\pm S_{\bar{x}}$) aus zehn (Kontrollen), bzw. sechs (Cocain) Versuchen. Die Geraden wurden durch Regressionsanalyse bestimmt. Die %-Aufnahmehemmung in Abb. 3b wurde aus den Mittelwerten der Kontroll- und der Cocain-Gruppe nach folgender Formel berechnet.

$$\% \text{ Hemmung} = 100 \cdot \left(1 - \frac{v \text{ Cocain}}{v \text{ Kontrolle}}\right) .$$

Dies ist im Einklang mit dem oben erwähnten Befund, daß der K_i-Wert für Cocain bei 25 mM Na^+ niedriger war als bei 140 mM Na^+.

3. EINFLUSS VON Na^+ AUF DIE INHIBITORISCHE WIRKUNG VON (-)METARAMINOL

Die kompetitive Hemmwirkung von Cocain auf die neuronale Aufnahme von ^{3}H-Noradrenalin läßt sich nicht aus einer strukturellen Ähnlichkeit beider Substanzen erklären. (-)Metaraminol hingegen besitzt einen mit Noradrenalin vergleichbaren chemischen Aufbau, so daß man eine Interaktion zwischen beiden Substanzen am neuronalen Aufnahmemechanismus erwarten könnte. Der Einfluß von (-)Metaraminol auf die neuronale ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahme wurde in Abhängigkeit verschiedener ^{3}H-Noradrenalin- und Na^+-Konzentrationen im Inkubationsmedium untersucht. Wie die Abb. 4a und b zeigen, verhielt sich auch (-)Metaraminol wie ein kompetitiver Hemmstoff der neuronalen ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahme, und zwar sowohl bei 140 mM Na^+ als auch bei 25 mM Na^+.

Die Berechnung der K_i-Werte für die Hemmwirkung von (-)Metaraminol auf die neuronale Aufnahme von ^{3}H-Noradrenalin ergab bei 140 mM Na^+ einen Wert von 1,3 µM, d.h. der K_i-Wert von (-)Metaraminol war bei dieser Na^+-Konzentration genauso groß wie der K_i-Wert von Cocain, und bei 25 mM Na^+ einen Wert von 5,23 µM - hier war der K_i-Wert von (-)Metaraminol um ein Vielfaches höher als der von Cocain. Bei Abnahme der Na^+-Konzentration im Inkubationsbad von 140 auf 25 mM Na^+ nimmt, im Gegensatz zum Cocain, der K_i-Wert für (-)Metaraminol um das Vierfache zu. Diese Werte zeigen, daß mit abnehmender Na^+-Konzentration die Hemmwirkung von (-)Metaraminol abnimmt.

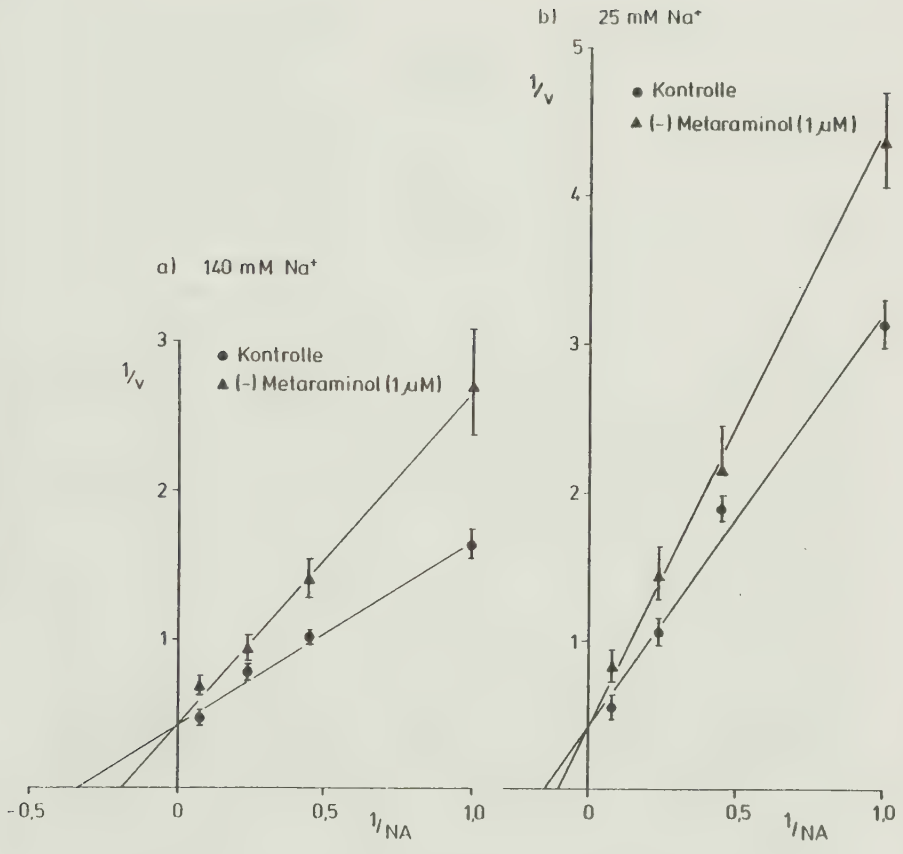

Abb. 4a und b: Lineweaver-Burk Analyse der Hemmwirkung von (-)Metaraminol auf die neuronale ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahme; Ductus deferens der Ratte. Ordinaten: $1/v$ (v = initiale neuronale ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahmerate in nMol $\cdot$ g^{-1} . min^{-1}). Abszissen: $1/NA$ (NA = Konzentration von ^{3}H-Noradrenalin im Inkubationsmedium in µM). Die experimentellen Bedingungen und die Methode zur Berechnung der neuronalen ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahme sind in der Legende zur Abb. 2 beschrieben. Die Na^+-Konzentration im Inkubationsmedium betrug 140 mM (Abb. 4a) oder 25 mM (Abb. 4b). Die ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahme wurde entweder unter Kontrollbedingungen oder in Gegenwart von 1 µM (-)Metaraminol gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte ($\pm S_{\bar{x}}$) aus mindestens sechs Versuchen. Die Geraden wurden durch Regressionsanalyse bestimmt.

Wie beim Cocain interessierte auch beim (-)Metaraminol die Frage, wie sich dieser Hemmstoff bezüglich Na^+ als variablem Substrat verhält. Abb. 5a zeigt, daß sich Kontroll- und (-)Metaraminol-Gerade nicht auf der Ordinate schneiden, (-)Metaraminol also kein kompetitiver Hemmstoff der neuronalen Aufnahme bezüglich Na^+ sein kann. Da sich in Gegenwart von (-)Metaraminol sowohl die Steigung als auch der Ordinatenschnittpunkt der Geraden im Vergleich zur Kontrollgeraden ändern, müßte es sich bei (-)Metaraminol um einen "mixed-type" Hemmstoff handeln, wenn man die Terminologie der Enzymkinetik auf den neuronalen Noradrenalin-Aufnahmemechanismus anwendet (Segel, 1975). Die Kontroll- und die (-)Metaraminol-Gerade liegen nicht parallel (s. Abb. 5a). Die lineare Regressionsanalyse ergab für die Kontrollgerade eine Steigung von $b = 47,8 \pm 0,5$ µM·min und für die Metaraminol-Gerade eine solche von $61,7 \pm 0,6$ µM·min. Die Tatsache, daß der Schnittpunkt der in Gegenwart von (-)Metaraminol gefundenen Geraden auf der Abszisse deutlich links vom Abszissenschnittpunkt der Kontrollgeraden liegt, deutet auch darauf hin, daß, wie oben schon erwähnt, die Hemmwirkung von (-)Metaraminol auf die neuronale Aufnahme von ^3H-Noradrenalin mit zunehmender Na^+-Konzentration zunimmt. Dieser Befund ist in Abb. 5b veranschaulicht.

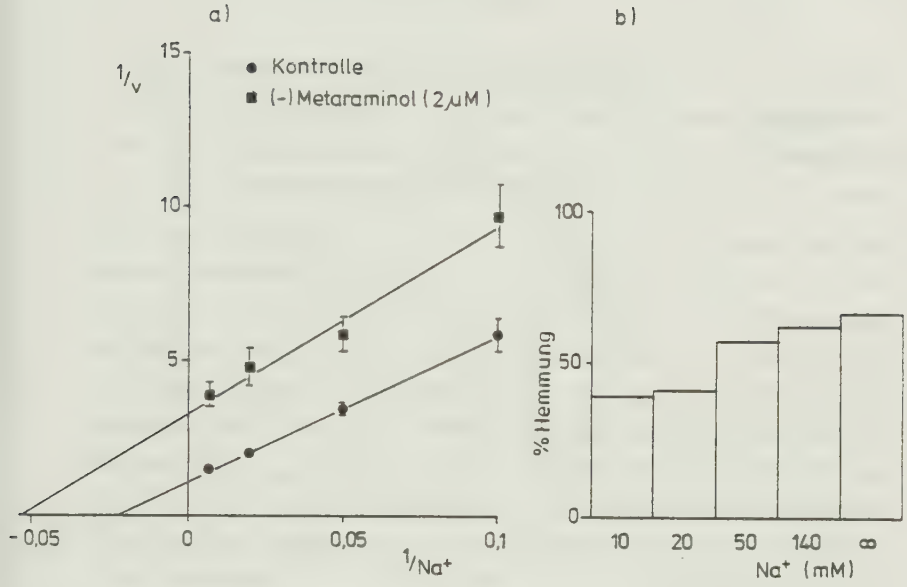

Abb. 5a und b: Einfluß der Na^+-Konzentration auf die Hemmwirkung von (-)Metaraminol auf die neuronale ^3H-Noradrenalin-Aufnahme; Ductus deferens der Ratte. Ordinaten: a: $1/v$ (v= initiale neuronale ^3H-Noradrenalin-Aufnahmerate in $nMol \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$). b: Aufnahmehemmung durch (-)Metaraminol in %. Abszissen: a: $1/Na^+$ (Na^+ = Na^+-Konzentration im Inkubationsmedium in mM). b: Na^+. Die experimentellen Bedingungen und die Methode zur Bestimmung der initialen ^3H-Noradrenalin-Aufnahmerate sind in der Legende zur Abb. 2 beschrieben. Die ^3H-Noradrenalin-Konzentration betrug 1,18 µM, und die Na^+-Konzentration im Inkubationsmedium lag zwischen 10 und 140 mM. Die Osmolarität wurde in Na^+-armen Lösungen durch TrisHCl (NaCl isosmolar durch TrisHCl ersetzt) aufrecht erhalten. Die Versuche wurden entweder unter Kontrollbedingungen oder in Gegenwart von 2 µM (-)Metaraminol durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte ($\pm S_{\bar{x}}$) aus 14 (Kontrollen), bzw. sechs (Metaraminol) Versuchen. Die Geraden wurden durch Regressionsanalyse bestimmt. Die %-Aufnahmehemmung in Abb. 5b wurde aus den Mittelwerten der Kontroll- und der (-)Metaraminol-Gruppe nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ Hemmung} = 100 \cdot \left(1 - \frac{v \text{ Metaraminol}}{v \text{ Kontrolle}}\right).$$

∞ bedeutet eine "unendlich hohe" Na^+-Konzentration, d.h. wenn $1/Na^+ = 0$ (s. Abb. 5a).

4. EINFLUSS VON Na^+ AUF DIE INHIBITORISCHE WIRKUNG VON (+)AMPHETAMIN

Nach Cocain und (-)Metaraminol wurde (+)Amphetamin, das strukturelle Ähnlichkeit mit Noradrenalin hat, auf seine Wirkung auf die neuronale ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahme untersucht, und zwar in Abhängigkeit von der Na^+-Konzentration im Inkubationsmedium.

Bei Anwesenheit von 25 mM Na^+ verhielt sich (+)Amphetamin (1 µM) wie ein kompetitiver Hemmstoff der neuronalen ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahme (Abb. 6b), da sich Kontrollgerade und Amphetamin-Gerade auf der Ordinate in einem gemeinsamen Punkt schneiden. Bei 140 mM Na^+ ergab sich jedoch, wie Abb. 6 a veranschaulicht, keine eindeutige kompetitive Hemmwirkung. Beide Geraden schneiden sich nicht direkt auf der Ordinate. Berechnet man die K_m- und V_{max}-Werte aus den Ergebnissen der Abb. 6a, ergibt sich folgendes: der K_m-Wert ändert sich von 2,91 µM (Kontrolle) auf 8,32 µM (Amphetamin), während sich der V_{max}-Wert von 2,36 nMol $\cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$ (Kontrolle) auf 1,69 nMol $\cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$ (Amphetamin) ändert. Die Änderung des K_m-Wertes ist also wesentlich größer als die des V_{max}-Wertes, so daß unter Berücksichtigung gewisser Fehlermöglichkeiten vielleicht doch eine kompetitive Hemmwirkung von (+)Amphetamin angenommen werden kann. In der Literatur wird (+)Amphetamin als kompetitiver Hemmstoff der neuronalen Noradrenalin-Aufnahme beschrieben (Horn et al., 1971), so daß die Annahme gerechtfertigt erscheint, daß es sich auch hier wie ein solcher verhält. Unter der Annahme, daß sich (+)Amphetamin sowohl bei 140 mM Na^+ als auch bei 25 mM Na^+ kompetitiv gegenüber ^{3}H-Noradrenalin verhält, lassen sich folgende K_i-Werte berechnen: K_i = 0,12 µM (bei 140 mM Na^+) und K_i = 0,36 µM (bei 25 mM Na^+).

Um den Einfluß der externen Na^+-Konzentration auf die Hemmwirkung von (+)Amphetamin näher untersuchen zu können, wurde die ^{3}H-Nor-

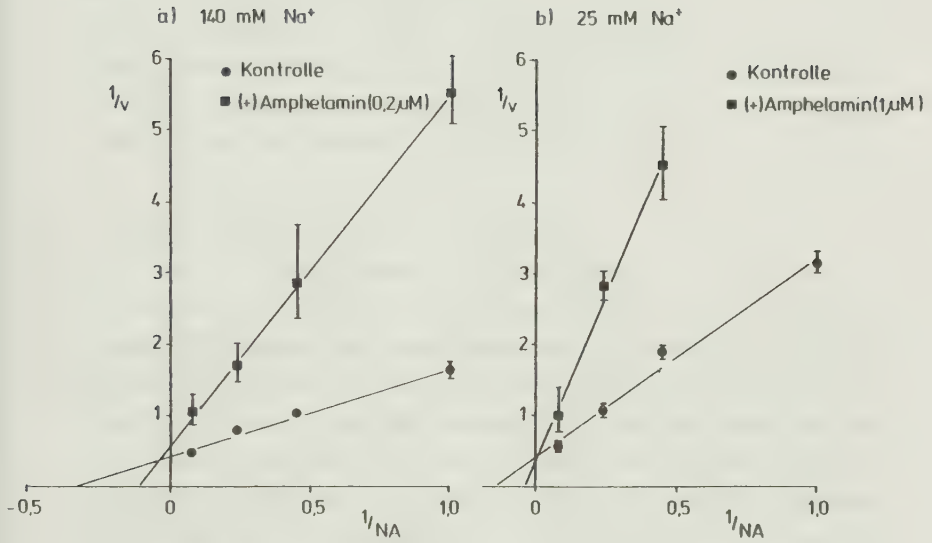

Abb. 6a und b: Lineweaver-Burk-Analyse der Hemmwirkung von (+)Amphetamin auf die neuronale ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahme; Ductus deferens der Ratte. Ordinaten: 1/v (v =initiale neuronale ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahmerate in nMol · g^{-1} · min^{-1}). Abszissen: 1/NA (NA = Konzentration von ^{3}H-Noradrenalin im Inkubationsmedium in µM). Die experimentellen Bedingungen und die Methode zur Berechnung der neuronalen ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahme sind in der Legende zur Abb. 2 beschrieben. Die Na^{+}-Konzentration im Inkubationsmedium betrug 140 mM (Abb. 6a) oder 25 mM (Abb. 6b). Die ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahme wurde entweder unter Kontrollbedingungen oder in Gegenwart von 0, 2 µM (Abb. 6a) bzw. 1 µM (Abb. 6b) (+)Amphetamin gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte ($\pm S_{\bar{x}}$) aus mindestens sechs Versuchen. Die Geraden wurden durch Regressionsanalyse bestimmt.

adrenalin-Aufnahme wieder bei verschiedenen Na^+-Konzentrationen (10 bis 140 mM) untersucht - Abb. 7a zeigt die Ergebnisse. Wie (-)Metaraminol verhielt sich auch (+)Amphetamin gegenüber Na^+ nicht wie ein kompetitiver Hemmstoff. Es liegt auch hier eine "mixed-type" Hemmung vor, da sich in Gegenwart von (+)Amphetamin sowohl Steigung als auch Ordinatenschnittpunkt der Gerade ändern. Der Schnittpunkt beider Geraden liegt links von der Ordinate und unterhalb der Abszisse.

Die Hemmwirkung von (+)Amphetamin nimmt, wie dies Abb. 7 b veranschaulicht, mit steigenden Na^+-Konzentrationen zu - bei "unendlich hohen" Na^+-Werten ergäbe sich eine Hemmwirkung von ungefähr 76 %. Dies ist eine Bestätigung der oben erwähnten Änderung der K_i-Werte für (+)Amphetamin mit der Na^+-Konzentration. Der inhibitorische Effekt von (+)Amphetamin zeigt eine geringere Na^+-Abhängigkeit als der von (-)Metaraminol (vgl. Abb. 5b und Abb. 7b). Dementsprechend nimmt bei Erniedrigung der Na^+-Konzentration von 140 auf 25 mM der K_i-Wert für (-)Metaraminol um das Vierfache zu, während er für (+)Amphetamin nur um den Faktor drei steigt.

Zusammenfassend läßt sich über die drei bisher besprochenen Hemmstoffe der neuronalen ^3H-Noradrenalin-Aufnahme folgendes sagen: alle drei Hemmstoffe verhalten sich sowohl bei 140 mM Na^+ als auch bei 25 mM Na^+ Noradrenalin gegenüber kompetitiv - gegenüber Na^+ als Substrat war allerdings nur Cocain kompetitiv, (-)Metaraminol und (+)Amphetamin waren "mixed-type" Inhibitoren. Dies bedeutet, daß die inhibitorische Wirkung von Cocain mit steigender Na^+-Konzentration abnahm, während diejenige von (-)Metaraminol und (+)Amphetamin zunahm.

(-)Metaraminol und (+)Amphetamin haben mit Noradrenalin eine große strukturelle Ähnlichkeit, so daß man aus diesem Grund Wechselwirkungen mit Noradrenalin am Noradrenalin-Transport-System erwarten

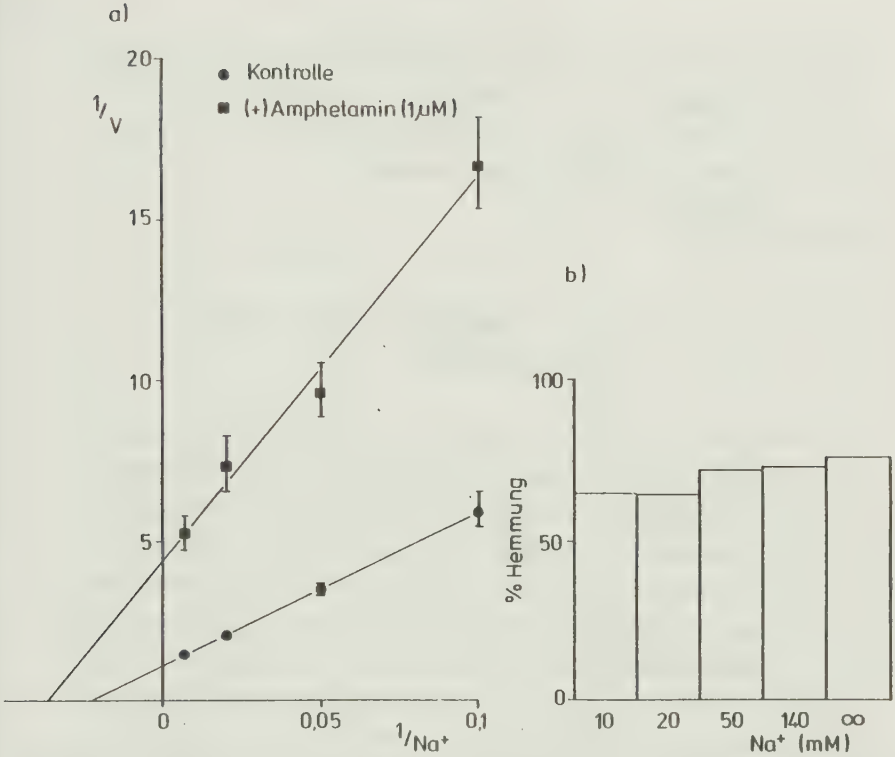

Abb. 7a und b: Einfluß der Na^+-Konzentration auf die Hemmwirkung von (+)Amphetamin auf die neuronale ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahme; Ductus deferens der Ratte. Ordinaten: a: $1/v$ (v = initiale neuronale ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahmerate in nMol · g^{-1} · min^{-1}). b: Aufnahmehemmung durch (+)Amphetamin in %. Abszissen: a: $1/Na^+$ (Na^+ = Na^+-Konzentration im Inkubationsmedium in mM). b: Na^+. Die experimentellen Bedingungen und die Methode zur Bestimmung der initialen ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahmerate sind in der Legende zur Abb. 2 beschrieben. Die ^{3}H-Noradrenalin-Konzentration betrug 1,18 µM, und die Na^+-Konzentration im Inkubationsmedium lag zwischen 10 und 140 mM. Die Osmolarität wurde in Na^+-armen Lösungen durch TrisHCl (NaCl isosmolar durch TrisHCl ersetzt) aufrecht erhalten. Die Versuche wurden entweder unter Kontrollbedingungen oder in Gegenwart von 1 µM (+)Amphetamin durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte ($\pm S_{\bar{x}}$) aus 14 (Kontrollen), bzw. sechs (Amphetamin) Versuchen. Die Geraden wurden durch Regressionsanalyse bestimmt. Die %-Aufnahmehemmung in Abb. 7b wurde aus den Mittelwerten der Kontroll- und der (+)Amphetamin-Gruppe nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ Hemmung} = 100 \cdot \left(1 - \frac{v \text{ Amphetamin}}{v \text{ Kontrolle}}\right).$$

∞ bedeutet eine "unendlich hohe" Na^+-Konzentration, d. h. wenn $1/Na^+ = 0$ (s. Abb. 7a).

könnte. Im folgenden werden zwei weitere Substanzen auf ihre Hemmwirkung auf die neuronale ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahme untersucht, die sich (wie Cocain) in ihrer Struktur deutlich von Noradrenalin unterscheiden, nämlich Nomifensin und Desipramin.

5. EINFLUSS VON Na^+ AUF DIE INHIBITORISCHE WIRKUNG VON NOMIFENSIN

Nomifensin erwies sich als kompetitiver Hemmstoff der neuronalen Aminaufnahme. Dieser Hemmtypus war bei beiden Na^+-Konzentrationen (140 und 25 mM) vorhanden (Abb. 8a und b). Der Hemmeffekt der hier verwendeten Nomifensin-Konzentration war bei beiden Na^+-Konzentrationen stärker als die Hemmeffekte aller bisher besprochenen Hemmstoffe. Die Berechnung der K_i-Werte für Nomifensin ergab K_i = 0,058 µM bei 140 mM Na^+ und K_i = 0,17 µM bei 25 mM Na^+. Damit ist Nomifensin ein wesentlich potenterer Hemmstoff als Cocain, (-)Metaraminol oder (+)Amphetamin. Ähnlich wie im Falle des (-)Metaraminols und (+)Amphetamins nimmt offenbar auch beim Nomifensin der Hemmeffekt mit steigender Na^+-Konzentration zu.

Die Untersuchung der neuronalen ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahme bei verschiedenen Na^+-Konzentrationen (10 bis 140 mM) erbrachte eine Zunahme des Nomifensin-Hemmeffektes mit steigenden Na^+-Konzentrationen von 43 % bei 10 mM Na^+ auf 67 % bei 140 mM Na^+, bzw. ungefähr 71 % bei "unendlich hohen" Na^+-Konzentrationen (Abb. 9b). Hier zeigt sich eine gegenüber den bisher besprochenen Hemmstoffen relativ große Na^+-Abhängigkeit der Hemmwirkung von Nomifensin. Gegenüber Na^+ als Substrat zeigt Nomifensin das Verhalten eines "mixed-type" Hemmstoffes (Abb. 9a). Die Kontroll- und Nomifensin-Gerade in Abb. 9a liegen nicht parallel, schneiden sich aber auch nicht auf der Ordinate, sondern links von der Ordinate unterhalb der Abszisse.

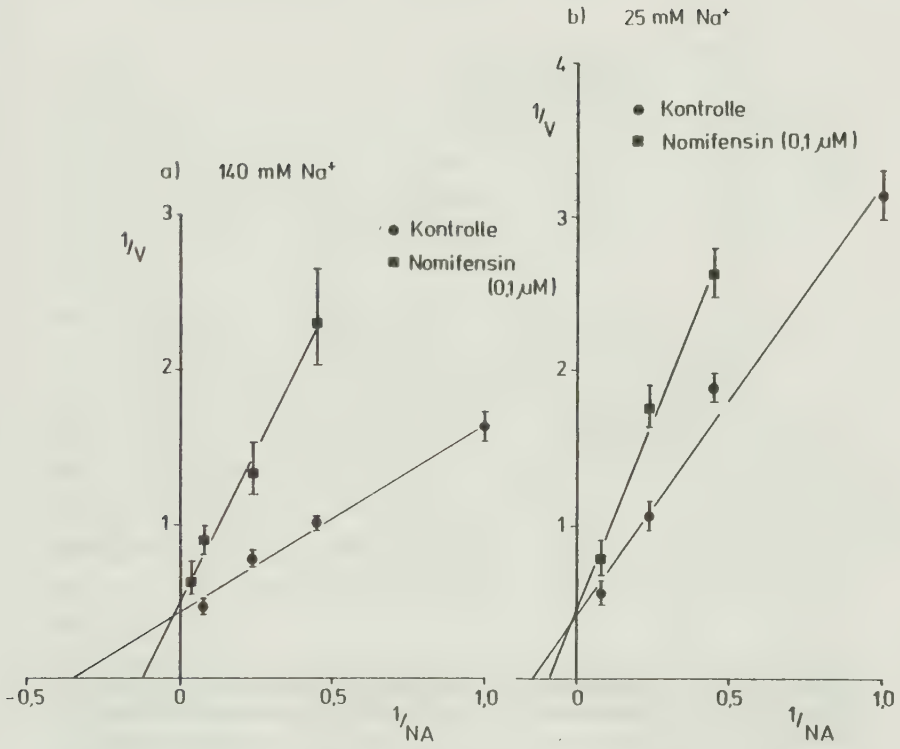

Abb. 8a und b: Lineweaver-Burk Analyse der Hemmwirkung von Nomifensin auf die neuronale ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahme; Ductus deferens der Ratte. Ordinaten: 1/v (v = initiale neuronale ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahmerate in nMol · g^{-1} · min^{-1}). Abszissen: 1/NA (NA = Konzentration von ^{3}H-Noradrenalin im Inkubationsmedium in µM). Die experimentellen Bedingungen und die Methode zur Berechnung der neuronalen Aufnahme von ^{3}H-Noradrenalin sind in der Legende zur Abb. 2 beschrieben. Die Na^{+}-Konzentration im Inkubationsmedium betrug 140 mM (Abb. 8a) oder 25 mM (Abb. 8b). Die ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahme wurde entweder unter Kontrollbedingungen oder in Gegenwart von 0,1 µM Nomifensin gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte ($\pm S_{\bar{x}}$) aus mindestens sechs Versuchen. Die Geraden wurden durch Regressionsanalyse bestimmt.

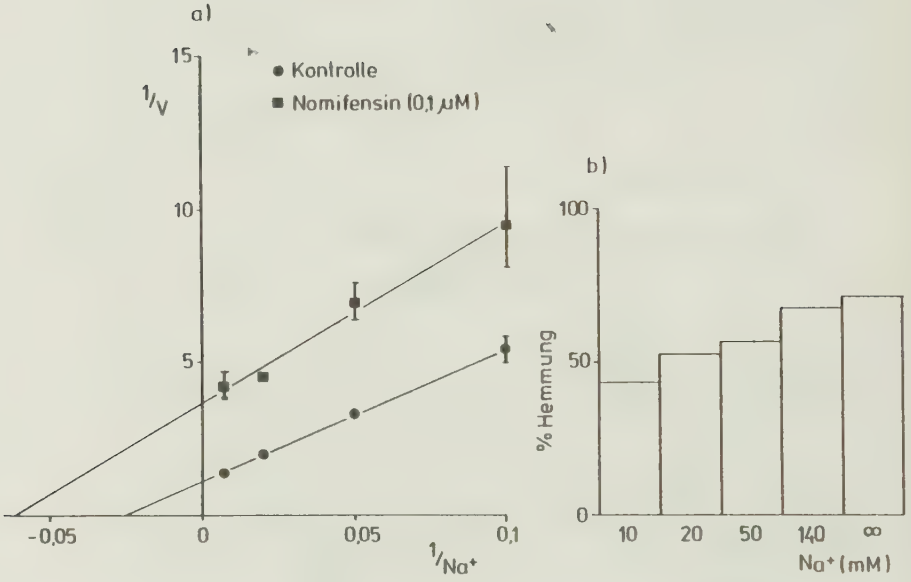

Abb. 9a und b: Einfluß der Na^+-Konzentration auf die Hemmwirkung von Nomifensin auf die neuronale ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahme; Ductus deferens der Ratte. Ordinaten: a: 1/v (v= initiale neuronale ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahmerate in nMol $\cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$). b: Aufnahmehemmung durch Nomifensin in %. Abszissen: a: $1/Na^+$ (Na^+ = Na^+-Konzentration im Inkubationsmedium in mM). b: Na^+. Die experimentellen Bedingungen und die Methode zur Bestimmung der initialen ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahmerate sind in der Legende zur Abb. 2 beschrieben. Die ^{3}H-Noradrenalin-Konzentration betrug 1,18 µM, und die Na^+-Konzentration im Inkubationsmedium lag zwischen 10 und 140 mM. Die Osmolarität wurde in Na^+-armen Lösungen durch TrisHCl (NaCl isosmolar durch TrisHCl ersetzt) aufrecht erhalten. Die Versuche wurden entweder unter Kontrollbedingungen oder in Gegenwart von 0,1 µM Nomifensin durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte ($\pm S_{\bar{x}}$) aus 20 (Kontrollen), bzw. neun (Nomifensin) Versuchen. Die Geraden wurden durch Regressionsanalyse bestimmt. Die %-Aufnahmehemmung in Abb. 9b wurde aus den Mittelwerten der Kontroll- und der Nomifensin-Gruppe nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ Hemmung} = 100 \cdot \left(1 - \frac{v \text{ Nomifensin}}{v \text{ Kontrolle}}\right).$$

∞ bedeutet eine "unendlich hohe" Na^+-Konzentration, d.h. wenn $1/Na^+ = 0$ (s. Abb. 9a).

6. EINFLUSS VON Na^+ AUF DIE INHIBITORISCHE WIRKUNG VON DESIPRAMIN

Iversen (1975) berichtete, daß Desipramin einer der stärksten Hemmstoffe der neuronalen Noradrenalin-Aufnahme sei. Die von ihm ermittelten K_i-Werte für Desipramin lagen zwischen 0,01 (Rattenherz) und 0,05 µM (Synaptosomen des Ratten-Hypothalamus). Die Aufnahmehemmung war kompetitiv bezüglich Noradrenalin als Substrat. Ähnliches wurde auch von anderen Autoren berichtet.

Bei den Versuchen, die dieser Arbeit zugrunde liegen, wurde zur Prüfung der Wirkung von Desipramin eine Konzentration von 0,1 bzw. 0,02 µM gewählt. Die Versuchsergebnisse sind in Abb. 10a und b wiedergegeben. Danach konnte weder für eine Desipramin-Konzentration von 0,1, noch für eine von 0,02 µM gezeigt werden, daß sich Desipramin bei 140 mM Na^+ wie ein kompetitiver Hemmstoff der neuronalen ^3H-Noradrenalin-Aufnahme verhält. Vielmehr ergab sich, daß Desipramin die neuronale Aminaufnahme wie ein "mixed-type" Hemmstoff beeinträchtigt.

Versuche mit 25 mM Na^+ ergaben, daß Desipramin sich unter diesen Bedingungen praktisch wie ein kompetitiver Antagonist der ^3H-Noradrenalin-Aufnahme verhielt (Abb. 10b).

Diese Ergebnisse lassen keine klare Aussage darüber zu, ob die inhibitorische Wirkung des Desipramins von der Na^+-Konzentration abhängig ist. Deshalb wurden auch hier Versuche mit konstanter Aminkonzentration und variabler Na^+-Konzentration durchgeführt. Die Resultate dieser Versuche sind in den Abbildungen 11, 12 und 13 dargestellt.

Für eine Desipramin-Konzentration von 0,04 µM ergab die Darstellung $1/v$ gegen $1/Na^+$ (Abb. 11) eine Gerade, deren Abstand zur Kontroll-Geraden mit steigender Na^+-Konzentration zunahm. Diesem

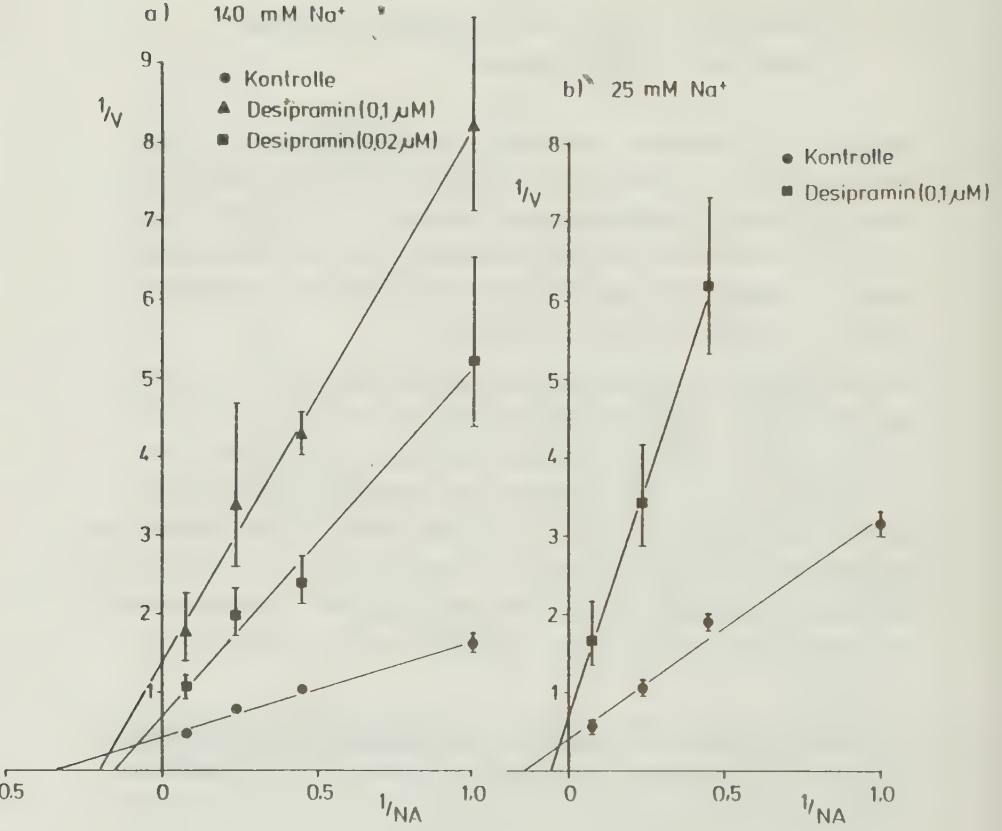

Abb. 10a und b: Lineweaver-Burk Analyse der Hemmwirkung von Desipramin auf die neuronale ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahme; Ductus deferens der Ratte. Ordinaten: 1/v (v = initiale neuronale ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahmerate in nMol · g^{-1} · min^{-1}). Abszissen: 1/NA (NA = Konzentration von ^{3}H-Noradrenalin im Inkubationsmedium in µM). Die experimentellen Bedingungen und die Methode zur Berechnung der neuronalen Aufnahme von ^{3}H-Noradrenalin sind in der Legende zur Abb. 2 beschrieben. Die Na^+-Konzentration im Inkubationsmedium betrug 140 mM (Abb. 10a) oder 25 mM (Abb. 10b). Die ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahme wurde entweder unter Kontrollbedingungen oder in Gegenwart von 0,1 und 0,02 µM (Abb. 10a), bzw. 0,1 µM (Abb. 10b) Desipramin gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte ($\pm S_{\bar{x}}$) aus mindestens sechs Versuchen. Die Geraden wurden durch Regressionsanalyse bestimmt.

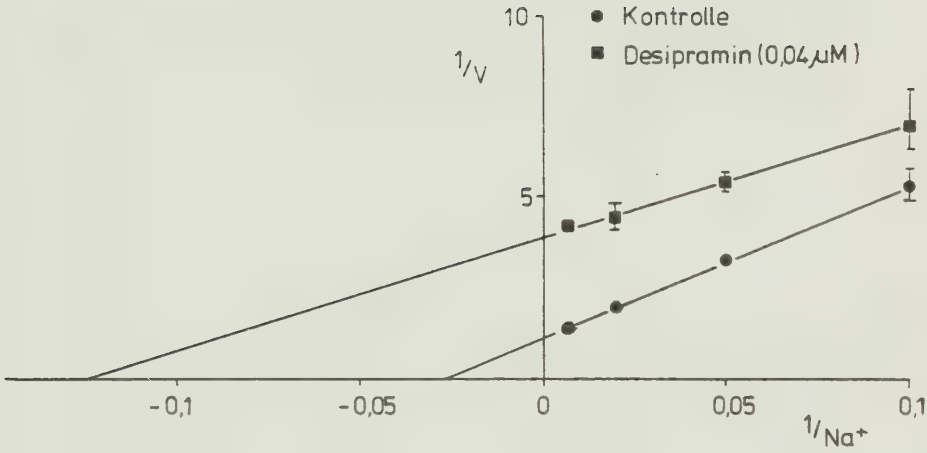

Abb. 11: Einfluß der Na^+-Konzentration auf die Hemmwirkung von Desipramin auf die neuronale ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahme; Ductus deferens der Ratte. Ordinate: 1/v (v = initiale neuronale ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahmerate in nMol · g^{-1} · min^{-1}). Abszisse: $1/Na^+$-(Na^+ = Na^+-Konzentration im Inkubationsmedium in mM). Die experimentellen Bedingungen und die Methode zur Bestimmung der initialen ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahmerate sind in der Legende zur Abb. 2 beschrieben. Die ^{3}H-Noradrenalin-Konzentration betrug 1,18 µM, und die Na^+-Konzentration im Inkubationsmedium lag zwischen 10 und 140 mM. Die Osmolarität wurde in Na^+-armen Lösungen durch TrisHCl (NaCl isosmolar durch TrisHCl ersetzt) aufrecht erhalten. Die Versuche wurden entweder unter Kontrollbedingungen oder in Gegenwart von 0,04 µM Desipramin durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte ($\pm S_{\bar{x}}$) aus 20 (Kontrollen), bzw. sechs (Desipramin) Versuchen. Die Geraden wurden durch Regressionsanalyse bestimmt.

Ergebnis läßt sich kein aus der Enzymkinetik bekannter Hemmtyp zuordnen.

Bei einer Konzentration von 0,1 µM verhielt sich Desipramin wie ein "mixed-type" Inhibitor bezüglich Na^+ als Substrat. Diese Ergebnisse sind in Abb. 12 wiedergegeben. Aus diesen Befunden geht ganz klar hervor, daß die aufnahmehemmende Wirkung von Desipramin mit steigender Na^+-Konzentration zunimmt (Abb. 13).

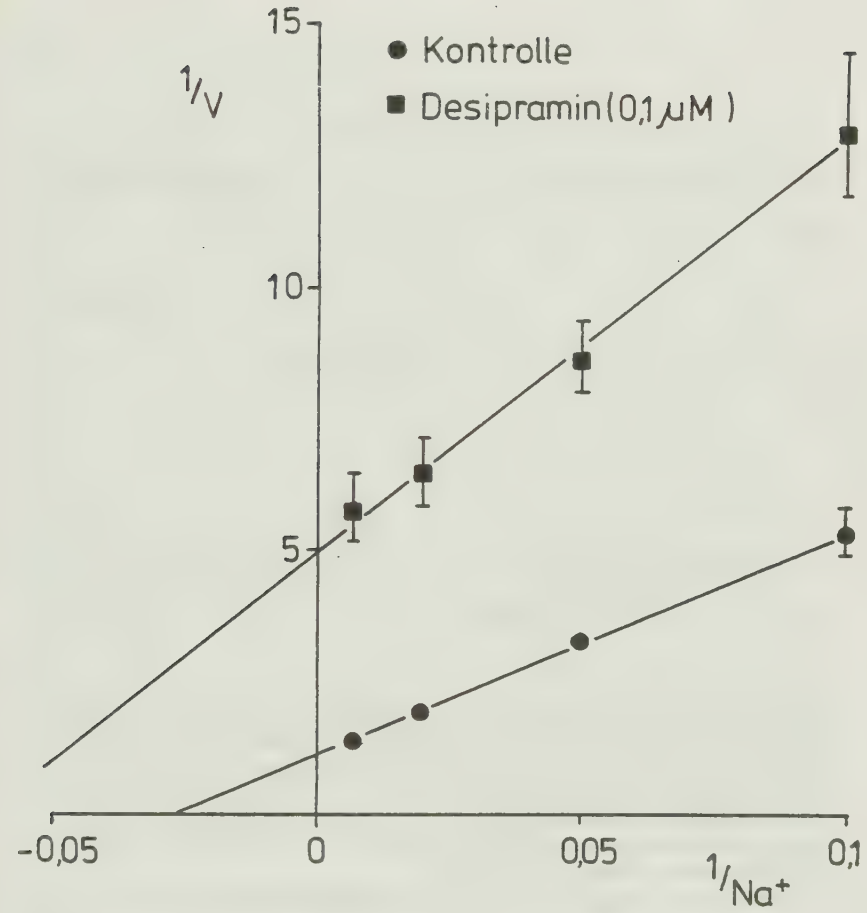

Abb. 12: Einfluß der Na^+-Konzentration auf die Hemmwirkung von Desipramin auf die neuronale ^3H-Noradrenalin-Aufnahme; Ductus deferens der Ratte. Ordinate: 1/v (v = initiale neuronale ^3H-Noradrenalin-Aufnahmerate in nMol · g^{-1} · min^{-1}). Abszisse: $1/Na^+$ (Na^+ = Na^+-Konzentration im Inkubationsmedium in mM). Die experimentellen Bedingungen und die Methode zur Bestimmung der initialen ^3H-Noradrenalin-Aufnahmerate sind in der Legende zur Abb. 2 beschrieben. Die ^3H-Noradrenalin-Konzentration betrug 1,18 µM, und die Na^+-Konzentration im Inkubationsmedium lag zwischen 10 und 140 mM. Die Osmolarität wurde in Na^+-armen Lösungen durch TrisHCl (NaCl isosmolar durch TrisHCl ersetzt) aufrecht erhalten. Die Versuche wurden entweder unter Kontrollbedingungen oder in Gegenwart von 0,1 µM Desipramin durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte ($\pm S_{\bar{x}}$) aus 20 (Kontrollen), bzw. sechs (Desipramin) Versuchen. Die Geraden wurden durch Regressionsanalyse bestimmt.

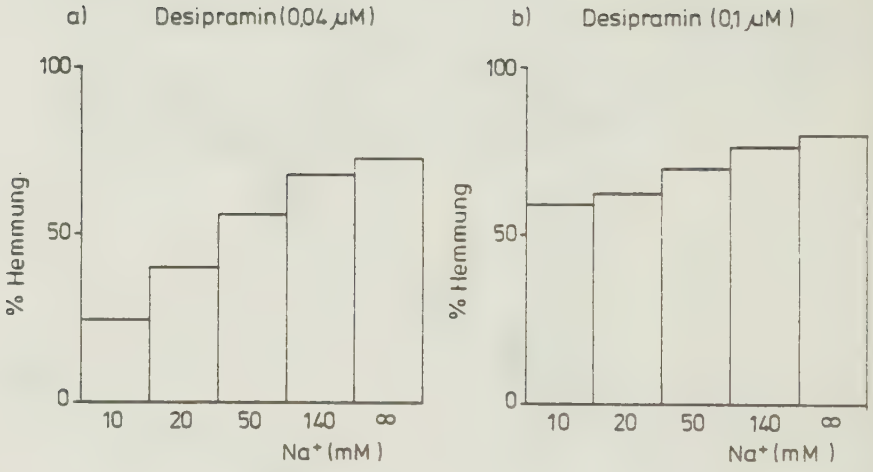

Abb. 13a und b: Einfluß der Na^+-Konzentration auf die Hemmwirkung von Desipramin auf die neuronale ^3H-Noradrenalin-Aufnahme; Ductus deferens der Ratte. Ordinate: Aufnahmehemmung durch Desipramin in %. Abszisse: Na^+ (Na^+ = Na^+-Konzentration im Inkubationsmedium in mM). Die %-Aufnahmehemmung wurde aus den Mittelwerten der Kontroll- und der Desipramin-Gruppen nach folgender Formel berechnet.

$$\% \text{ Hemmung} = 100 \cdot \left(1 - \frac{v \text{ Desipramin}}{v \text{ Kontrolle}}\right).$$

Zugrunde liegen die Ergebnisse der Abb. 11 und 12.
∞ bedeutet eine "unendlich hohe" Na^+-Konzentration, d.h. wenn $1/Na^+ = 0$ (s. Abb. 11 und 12).

II. EFFLUX-VERSUCHE

Die bisher dargestellten Aufnahme-Versuche haben gezeigt, daß die untersuchten Hemmstoffe (mit Ausnahme von Desipramin bei 140 mM Na^+) die ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahme kompetitiv hemmen, und daß (mit Ausnahme des Cocains) die Hemmwirkung mit steigender Na^+-Konzentration zunimmt; mit Ausnahme von Cocain verhielten sich die untersuchten Hemmstoffe gegenüber Na^+ wie "mixed-type" Inhibitoren. Da sich Nomifensin und Desipramin bezüglich der Na^+-Abhängigkeit ihrer Hemmeffekte wie die Substrate (-)Metaraminol und (+)Amphetamin verhielten, war es von Interesse herauszufinden, ob sich z.B. Nomifensin auch in Auswasch(Efflux)-Versuchen wie ein Substrat verhält. Es ist bekannt, daß Na^+-freie Lösungen den neuronalen Efflux von ^{3}H-Noradrenalin stark beschleunigen (Paton, 1973). Es sollte deshalb geprüft werden, in welcher Weise Nomifensin und (-)Metaraminol diesen beschleunigten Noradrenalin-Efflux beeinflussen. Zum Vergleich wurden auch Cocain und (+)Amphetamin getestet. Die Konzentration der Hemmstoffe wurde so gewählt, daß sie bei 140 mM Na^+ eine etwa gleich starke Hemmung der ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahme hervorrufen würde. Im einzelnen wurden die Substanzen in folgenden Konzentrationen verwendet: Cocain (2 µM); Nomifensin (0,1 µM); (+)Amphetamin (0,5 µM); (-)Metaraminol (1,5 µM).

Nach 30-minütiger Inkubation mit 0,97µM ^{3}H-Noradrenalin wurden die Ductus deferentes von mit Reserpin vorbehandelten Ratten (Monoaminoxidase und Catechol-O-Methyltransferase gehemmt) mit aminfreier Lösung ausgewaschen. Drei Versuchsgruppen wurden durchgeführt. Bis zur 100. min enthielt das Auswaschmedium in allen drei Versuchsgruppen 140 mM Na^+; von der 101. bis zur 115. min enthielt das Auswaschmedium dann entweder 0 mM Na^+ (140 mM NaCl isosmolar durch TrisHCl ersetzt), 0 mM Na^+ plus Hemmstoff oder 140 mM Na^+ plus Hemmstoff. Genauere Einzelheiten zum Versuchsablauf finden sich im Kapitel "Methodik".

In den Abb. 14 bis 18 ist die FRL für die 85. bis 115. min jeweils in 1-minütigen Abständen gegen die Zeit aufgetragen. Die FRL (d.h. die in jeder min aus dem Gewebe abgegebene Menge an Tritium ausgedrückt als Bruchteil der Menge an ^{3}H-Noradrenalin, die sich zu diesem Zeitpunkt noch im Gewebe befand; s. Methodik) erreichte nach anfänglichem Abfall (nicht dargestellt) in der Zeit zwischen der 85. und 100. min einen konstant bleibenden Wert. Zur Angabe der Menge von ^{3}H-Noradrenalin, die sich im Gewebe bzw. im Bad befand, muß angemerkt werden, daß sich zwar im Gewebe praktisch nur unverändertes ^{3}H-Noradrenalin befindet, die in das Auswaschmedium abgegebene Radioaktivität aber nur zu ungefähr 20 % aus unverändertem ^{3}H-Noradrenalin besteht. Der Rest der Radioaktivität im Auswaschmedium besteht bei den beschriebenen Versuchsbedingungen trotz Hemmung der Monoaminoxidase und Catechol-O-Methyltransferase aus ^{3}H-Noradrenalin-Metaboliten (Graefe und Fuchs, 1979). Die in der Zeit zwischen 85. und 100. min ermittelte FRL betrug für alle drei Versuchsgruppen ungefähr 0,01 min^{-1}. Erst bei Änderung der Zusammensetzung des Auswaschmediums von der 101. min an zeigte sich für jede der drei Versuchsgruppen (und für jeden der untersuchten Hemmstoffe) ein charakteristischer Kurvenverlauf.

1. EINFLUSS VON COCAIN AUF DEN NEURONALEN EFFLUX VON ^{3}H-NORADRENALIN

Wie die Ergebnisse mit Cocain zeigen (Abb. 14), bewirkte dieser Hemmstoff eine signifikante Steigerung der FRL, wenn die Na^+-Konzentration im Auswaschmedium 140 mM betrug (Testung im gepaarten t-Test, $P < 0,01$). Dieses Verhalten ist aus der Literatur bekannt (Lindmar und Löffelholz, 1974; Ross und Kelder, 1979).

Das Fehlen von Na^+ in der Auswaschlösung (0 Na^+) hatte eine enorme Effluxbeschleunigung zur Folge (Abb. 14); die FRL nahm von ungefähr 0,01 min^{-1} auf 0,076 min^{-1} zu und nahm danach langsam wieder ab. Das Na^+-freie Auswaschmedium bewirkte also eine Effluxsteigerung um ungefähr das 7 1/2-fache. Die Versuche von Graefe und Fuchs (1979) haben gezeigt, daß dieser Effluxsteigerung eine Zunahme des Efflux von unverändertem ^{3}H-Noradrenalin zugrunde liegt.

Die Effluxbeschleunigung durch Na^+-freies Medium wurde in Anwesenheit von Cocain ("0 Na^+ plus Cocain", Abb. 14) deutlich gehemmt. Der signifikante Unterschied zwischen der "0 Na^+"-Kurve und der "0 Na^+ plus Cocain"-Kurve war nach der 15. min (Ende des Auswaschversuchs) nicht mehr nachweisbar.

Wie schon in den Aufnahmeversuchen erwies sich Cocain auch in den Auswaschversuchen als ein wirksamer Hemmstoff des ^{3}H-Noradrenalin-Transports: die Beschleunigung des ^{3}H-Noradrenalin-Auswärtstransports (ausgelöst durch das Fehlen von extrazellulärem Na^+) wird durch Cocain deutlich beeinträchtigt. Im Gegensatz dazu wurde der Ruhe-Efflux von ^{3}H-Noradrenalin (140 mM Na^+) durch die verwendete Cocain-Konzentration signifikant gesteigert.

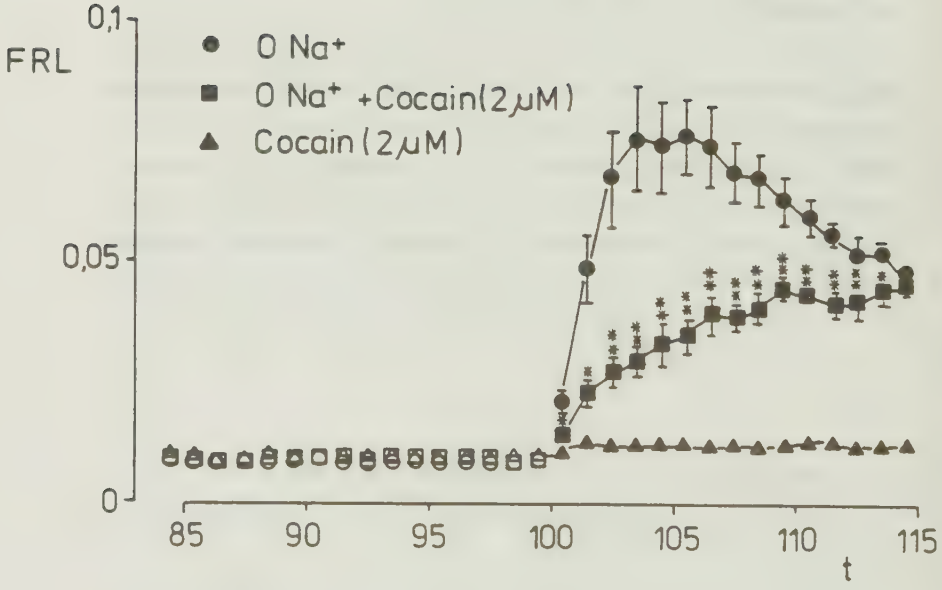
0,1
FRL
0,05
0
0 Na+
0 Na+ +Cocain(2µM)
Cocain (2µM)
85
90
95
100
105
110
115
t

Abb. 14: Einfluß von Cocain auf den neuronalen Efflux von ^{3}H-Noradrenalin am Ductus deferens der Ratte.
Ordinate: FRL = fractional rate of loss in min^{-1}.
Abszisse: t = Zeit nach Beginn des Auswaschens in min.
Ductus deferentes von mit Reserpin vorbehandelten Ratten wurden zunächst mit 0,97 µM ^{3}H-Noradrenalin inkubiert (30 min) und dann mit aminfreier Lösung ausgewaschen (115 min). Die Monoaminoxidase und die Catechol-O-Methyltransferase wurden während des ganzens Versuchs gehemmt (s. Methodik). Während des Auswaschens wurden die Inkubationsbäder in 1-min Intervallen gewechselt und die vom Gewebe abgegebene Radioaktivität gemessen. Außerdem wurde der ^{3}H-Noradrenalin-Gehalt des Gewebes am Ende des Versuches bestimmt. Die FRL wurde für jedes Auswaschintervall berechnet, d.h. die in jeder min aus dem Gewebe abgegebene Menge an Tritium wurde als Bruchteil der Menge an ^{3}H-Noradrenalin ausgedrückt, die sich zu diesem Zeitpunkt im Gewebe befand.

Das Auswaschmedium enthielt in allen drei experimentellen Gruppen bis zur 100. min 140 mM Na^+ und von der 101. bis 115. min entweder 0 mM Na^+ (140 mM NaCl isosmolar durch TrisHCl ersetzt; ● —●), 0 mM Na^+ plus 2 µM Cocain (■ —■) oder 140 mM Na^+ plus 2 µM Cocain (▲ —▲). Gezeigt sind Mittelwerte ($\pm S_{\bar{x}}$) von mindestens drei Versuchen. Die Sternchen zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe " 0 Na^+" und der Gruppe "0 Na^+ plus Cocain" (t-Test): ✱ $P < 0,05$; ✱ ✱ $P < 0,01$.

2. EINFLUSS VON NOMIFENSIN AUF DEN NEURONALEN EFFLUX VON ^{3}H-NORADRENALIN

Nomifensin (0,1 µM) bewirkte bei einer Na^+-Konzentration von 140 mM eine signifikante Zunahme der FRL (Testung im gepaarten t-Test, $P < 0,005$; Abb. 15), ließ sich also hierin mit Cocain vergleichen. Diese Ähnlichkeit im Verhalten blieb auch dann nachweisbar, wenn Nomifensin dem Na^+-freien Medium zugesetzt wurde. Zwar sind die Befunde nicht so eindeutig wie mit Cocain, die Kurve "0 Na^+ plus Nomifensin" zeigt aber die charakteristische initiale Hemmung des 0 Na^+-Efflux. Im weiteren Verlauf nähert sich die Kurve "0 Na^+ plus Nomifensin" zusehends der Kontrollkuve (0 Na^+; Abb. 15).

Ein Vergleich der entsprechenden Kurven von Abb. 14 und 15 bringt folgendes Ergebnis: 1. Nomifensin und Cocain hemmen initial den durch 0 Na^+ beschleunigten Efflux von ^{3}H-Noradrenalin; 2. Nomifensin und Cocain wurden bezüglich ihrer Aufnahme-Hemmung bei 140 mM Na^+ in equieffektiven Konzentrationen verwendet (d.h. in Konzentrationen, die etwa 1,5-fach über dem bei 140 mM Na^+ bestimmten K_i-Wert liegen). Dennoch hatte Cocain bei Na^+-freiem Auswaschmedium eine weitaus stärkere Hemmwirkung auf den neuronalen Efflux von ^{3}H-Noradrenalin als Nomifensin. Diese Beobachtung bestätigt die im ersten Teil dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse, nämlich, daß die Hemmwirkung von Cocain auf den neuronalen ^{3}H-Noradrenalin-Transport durch das Fehlen von extrazellulärem Na^+ nicht beeinträchtigt wird, während der Hemmeffekt von Nomifensin in Abwesenheit von extrazellulärem Na^+ deutlich vermindert wird.

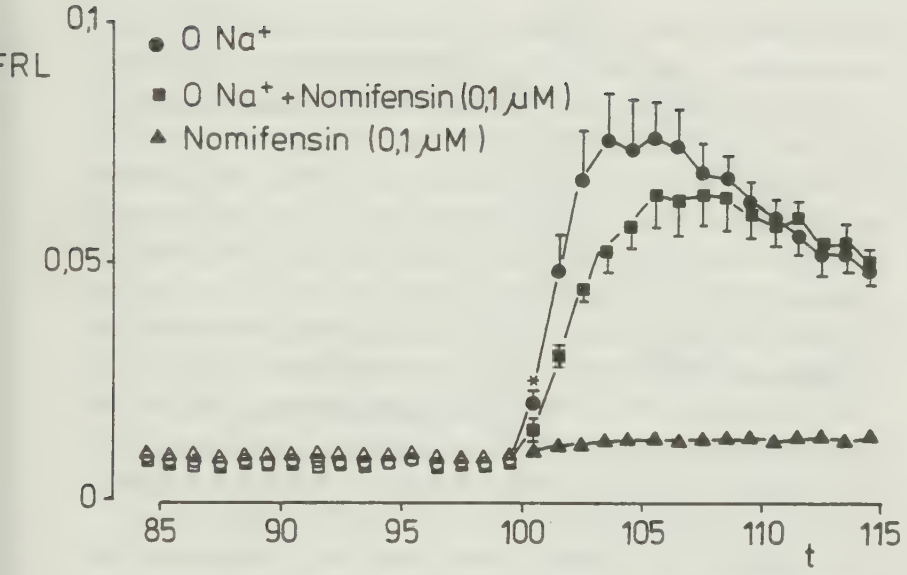

Abb. 15: Einfluß von Nomifensin auf den neuronalen Efflux von ^{3}H-Noradrenalin am Ductus deferens der Ratte. Ordinate: FRL = fractional rate of loss in min^{-1}. Abszisse: t = Zeit nach Beginn des Auswaschens in min. Der Versuchsaufbau und die experimentellen Bedingungen sind in der Legende zur Abb. 14 beschrieben.

Das Auswaschmedium enthielt in allen drei experimentellen Gruppen bis zur 100. min 140 mM Na^+ und von der 101. bis zur 115. min entweder 0 mM Na^+ (140 mM NaCl isosmolar durch TrisHCl ersetzt; ●——●), 0 mM Na^+ plus 0,1 µM Nomifensin (■——■) oder 140 mM Na^+ plus 0,1 µM Nomifensin (▲——▲). Gezeigt sind Mittelwerte ($\pm S_{\bar{x}}$) von mindestens drei Versuchen. Die Sternchen zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe "0 Na^+" und der Gruppe " 0 Na^+ plus Nomifensin" (t-Test): ✳ $P < 0,05$.

3. EINFLUSS VON (+)AMPHETAMIN AUF DEN NEURONALEN EFFLUX VON ^{3}H-NORADRENALIN

Die Anwesenheit von (+)Amphetamin (0,5 µM) im Auswaschmedium bewirkte bei 140 mM Na^+ eine vorübergehende Steigerung des Efflux mit einer Zunahme der FRL von basal ungefähr 0,01 min^{-1} auf 0,035 min^{-1} (Abb. 16). Dieser Effekt des (+)Amphetamins auf den ^{3}H-Noradrenalin-Efflux könnte darin begründet sein, daß (+)Amphetamin bei Anwesenheit von extrazellulärem Na^+ an den Noradrenalin-Carrier gebunden und in das Neuron transportiert wird, um intraneuronal den Carrier wieder frei zu geben, der dann für den Auswärtstransport von ^{3}H-Noradrenalin zur Verfügung steht. Die Zunahme der Verfügbarkeit intraneuronaler Carriermoleküle äußert sich dann in einer Zunahme der FRL. Diese Theorie wird bekräftigt durch den Vergleich der Kontrollkurve "0 Na^+" mit der Kurve "0 Na^+ plus (+)Amphetamin". Diese Kurven zeigen, daß (+)Amphetamin in Na^+-freier Auswaschlösung initial die durch "0 Na^+" bewirkte Efflux-Beschleunigung noch signifikant erhöht (Abb. 16). Offensichtlich führt der Wechsel der Na^+-Konzentration von 140 mM auf 0 mM nicht zu einer sofortigen Beseitigung aller Na^+-Ionen in der extrazellulären Flüssigkeit nahe den sympathischen Nervenenden, so daß in den ersten Minuten nach dem Wechsel (+)Amphetamin noch aufgenommen wird und so den ^{3}H-Noradrenalin-Efflux wie oben beschrieben beschleunigt. Es ist wichtig darauf hinzuweisen, daß (+)Amphetamin die durch das Fehlen von extrazellulärem Na^+ hervorgerufene Beschleunigung des neuronalen Efflux nicht beeinträchtigt.

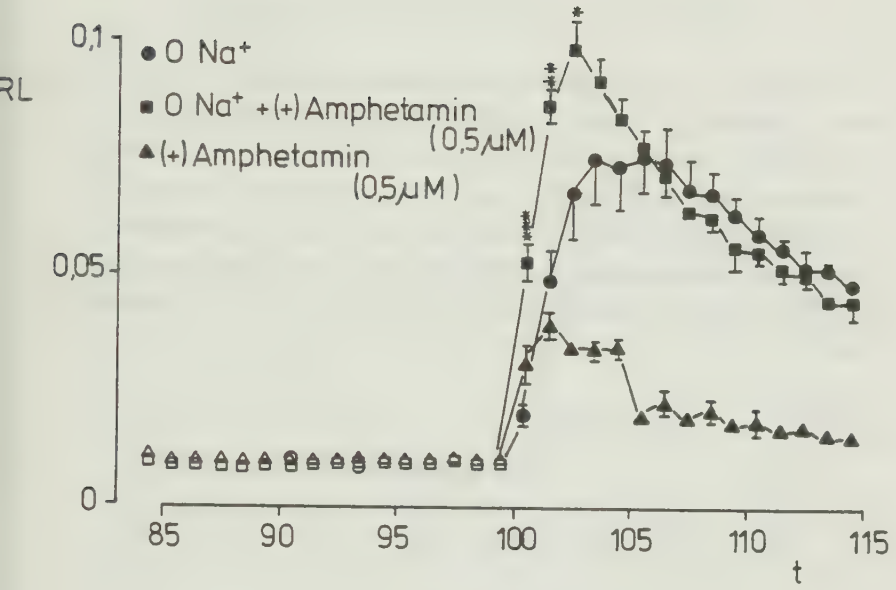

Abb. 16: Einfluß von (+)Amphetamin auf den neuronalen Efflux von ^{3}H-Noradrenalin am Ductus deferens der Ratte. Ordinate: FRL = fractional rate of loss in min^{-1}. Abszisse: t = Zeit nach Beginn des Auswaschens in min. Der Versuchsaufbau und die experimentellen Bedingungen sind in der Legende zur Abb. 14 beschrieben.

Das Auswaschmedium enthielt in allen drei experimentellen Gruppen bis zur 100. min 140 mM Na^+ und von der 101. bis zur 115. min entweder 0 mM Na^+ (140 mM NaCl isosmolar durch TrisHCl ersetzt; ● — ●), 0 mM Na^+ plus 0,5 µM (+)Amphetamin (■ — ■) oder 140 mM Na^+ plus 0,5 µM (+)Amphetamin (▲ — ▲). Gezeigt sind Mittelwerte ($\pm S_{\bar{x}}$) von mindestens drei Versuchen. Die Sternchen zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe "0 Na^+" und der Gruppe "0 Na^+plus (+)Amphetamin" (t-Test): ✳ $P < 0,05$; ✳ ✳ $P < 0,01$; ✳ ✳ ✳ $P < 0,001$.

4. EINFLUSS VON (-)METARAMINOL AUF DEN NEURONALEN EFFLUX VON ^{3}H-NORADRENALIN

Die Zugabe von (-)Metaraminol zum Auswaschmedium bewirkte sowohl in Gegenwart, als auch in Abwesenheit von extrazellulärem Na^{+} eine Beschleunigung des ^{3}H-Noradrenalin-Efflux (Abb. 17). Die Beschleunigung des 0 Na^{+}-Efflux war nur initial (d.h. in der ersten Auswaschprobe) nachweisbar. Qualitativ sind diese Ergebnisse mit denen nach (+)Amphetamin vergleichbar. Das Ausmaß der Wirkungen von (-)Metaraminol war aber deutlich geringer als das von (+)Amphetamin.

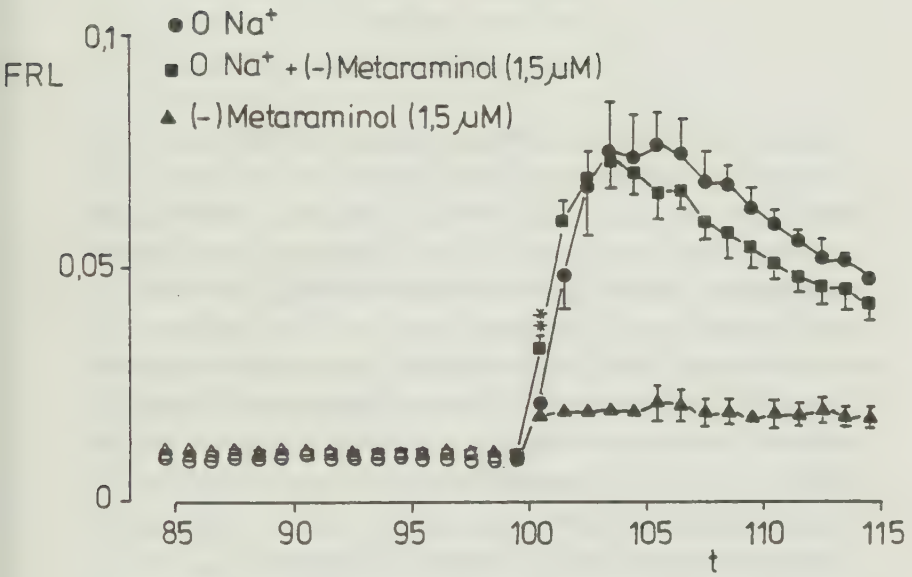

Abb. 17: Einfluß von (-)Metaraminol auf den neuronalen Efflux von ^{3}H-Noradrenalin am Ductus deferens der Ratte. Ordinate: FRL = fractional rate of loss in min^{-1}. Abszisse: t = Zeit nach Beginn des Auswaschens in min. Der Versuchsaufbau und die experimentellen Bedingungen sind in der Legende zur Abb. 14 beschrieben.

Das Auswaschmedium enthielt in allen drei experimentellen Gruppen bis zur 100. min 140 mM Na^+ und von der 101. bis zur 115. min entweder 0 mM Na^+ (140 mM NaCl isosmolar durch TrisHCl ersetzt; ●—●); 0 mM Na^+ plus 1,5 µM (-)Metaraminol (■ — ■) oder 140 mM Na^+ plus 1,5 µM (-)Metaraminol (▲ — ▲). Gezeigt sind Mittelwerte ($\pm S_{\bar{x}}$) von mindestens drei Versuchen. Die Sternchen zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe "0 Na^+" und der Gruppe "0 Na^+plus (-)Metaraminol" (t-Test): ✳✳ $P < 0,01$.

D) DISKUSSION

Im Jahre 1966 wurde erstmals beschrieben, daß die Aufnahme von Noradrenalin in sympathische Nervenendigungen von der extrazellulären Na^+-Konzentration abhängt (Iversen und Kravitz, 1966; Bogdanski und Brodie, 1966). Diese Autoren zeigten, daß die Geschwindigkeit der neuronalen Aufnahme von Noradrenalin mit steigender Na^+-Konzentration zunimmt. Diese Beobachtung wurde später von zahlreichen Autoren bestätigt, so daß man sehr bald von der neuronalen Aufnahme als einem Na^+-abhängigen Membrantransportmechanismus sprach. Von anderen Na^+-abhängigen Transportprozessen (z.B. Zucker- und Aminosäuretransport in den Mukosaepithelien der Darmschleimhaut oder in den Tubulusepithelien der Niere) weiß man, daß die Zunahme der Transportgeschwindigkeit durch Na^+ auf eine Zunahme der V_{max}, eine Abnahme des K_m-Wertes für das Substrat oder auf eine Veränderung beider Parameter zurückgehen kann. Die Klärung dieser Frage für die neuronale Aufnahme von Noradrenalin haben zahlreiche Autoren versucht. Die Einigkeit bezüglich der Frage, daß es sich bei der neuronalen Aufnahme um einen Na^+-abhängigen Membrantransportmechanismus handelt, wurde getrübt durch die Uneinigkeit in der Frage, welcher der beiden Transportparameter (V_{max} oder K_m) durch Na^+ beeinflußt wird. Einige Autoren fanden, daß Na^+ die V_{max} des Transports erhöht (Sugrue und Shore, 1969; White und Paton, 1972), andere dagegen beobachteten eine Abnahme des K_m-Wertes für Noradrenalin (ohne Veränderung der V_{max}) mit steigenden Na^+-Konzentrationen (Bogdanski et al., 1970; Sánchez-Armáss und Orrego, 1978).

In einer kürzlich erschienenen Arbeit von Sammet und Graefe (1979) wurde gezeigt, daß die Uneinigkeit in der Literatur bezüglich der Effekte von Na^+ auf die Kinetik der neuronalen Aufnahme von Noradrenalin

vermutlich auf methodische Probleme zurückgeführt werden kann. So wurden z. B. Ersatzionen für Na^+ verwendet (Li^+ und Cholin$^+$), die nicht "inert" sind und selbst die neuronale Aufnahme hemmen (Keller und Graefe, 1979). Von den vielen möglichen Ersatzkationen, die zur Aufrechterhaltung der Osmolarität in Na^+-armen Inkubationslösungen verwendet werden können, haben Keller und Graefe (1979) nur das $Tris^+$ als ein Kation charakterisiert, das keine Eigenwirkung (d.h. keinen hemmenden Einfluß auf den Noradrenalin-Transport) hat. Viele Autoren haben kein Ersatzkation, sondern Saccharose zur Herstellung isosmolarer Na^+-armer Lösungen verwendet. Da aber die Gegenwart von extrazellulärem Cl^- für die Funktion der neuronalen Aufnahme ebenfalls erforderlich ist (Sánchez-Armáss und Orrego, 1977), können diejenigen Untersuchungen, in denen Saccharose als Ersatz für NaCl verwendet wurde, zur Klärung des Einflusses von Na^+ auf die kinetischen Parameter der neuronalen Aufnahme nicht herangezogen werden.

Ein anderes Problem, das bei Studien mit Na^+-armen Inkubationslösungen von den meisten Autoren nicht bedacht wurde, ist die Tatsache, daß Na^+-arme Lösungen zur Freisetzung von endogenem Noradrenalin führen. Das freigesetzte endogene Noradrenalin verdünnt dann die spezifische Aktivität des als Substrat verwendeten radioaktiv markierten Noradrenalins und kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Diese Fehlermöglichkeit wurde eindrucksvoll von Sánchez-Armáss und Orrego (1978) in Versuchen mit dem Ductus deferens der Ratte demonstriert. Diese Autoren führten aus, daß zum Studium der Effekte von Na^+ auf die Kinetik der neuronalen Aufnahme von Noradrenalin Organe oder Gewebe von mit Reserpin vorbehandelten Tieren verwendet werden sollten. Reserpin entleert die endogenen Noradrenalinspeicher der sympathischen Nervenendigungen.

Bei der vorliegenden Arbeit wurde daher methodisch auf folgende Punkte besonderer Wert gelegt: erstens wurde als Ersatz für Na^+ in Na^+-armen Lösungen $Tris^+$ als "inertes" Ersatzkation (Keller und Graefe,

1979) verwendet, und zweitens wurden die endogenen Noradrenalin-Speicher durch Vorbehandlung der Tiere mit Reserpin entleert, d.h. der Noradrenalin-Gehalt am Ductus deferens nahm auf ca. 0,7 % der Kontrolle ab (Keller und Graefe, 1979).

Unter Berücksichtigung eben dieser methodischen Probleme wurde der Einfluß von Na^+ auf die neuronale Aufnahme von Noradrenalin in der Arbeit von Sammet und Graefe (1979) neu untersucht. Die Ergebnisse machen deutlich, daß steigende extrazelluläre Na^+-Konzentrationen die V_{max} des Transports erhöhen und den K_m für Noradrenalin vermindern. Aufgrund kinetischer Analysen der Ergebnisse kamen die Autoren zu dem Schluß, daß es sich bei der neuronalen Aufnahme um eine Bi-Substratreaktion handelt, bei der Noradrenalin und Na^+ im Verhältnis 1:1 an den Carrier gebunden werden müssen, damit Noradrenalin durch die axonale Membran in das sympathische Nervenende transportiert wird.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es nun herauszufinden, ob auch die Wirkung von Hemmstoffen der neuronalen Aufnahme von der extrazellulären Na^+-Konzentration abhängt. Wenn nämlich der Transport von Substraten an die Anwesenheit von Na^+ gebunden ist, sollte auch der Hemmeffekt kompetitiver Inhibitoren des Transports von der Anwesenheit von Na^+ abhängen. Die gewählten Versuchsbedingungen waren identisch mit denen, die von Sammet und Graefe (1979) beschrieben wurden. Auch die Methode der Messung der neuronalen Aufnahme von Noradrenalin stimmt mit der von Sammet und Graefe (1979) überein; d.h. im gleichen Ductus deferens wurde die Gesamtaufnahme und die extraneuronale Verteilung von Noradrenalin in parallelen Versuchsansätzen gemessen, und die neuronale Aufnahme ergab sich aus der Differenz zwischen beiden Ergebnissen. Als kompetitive Hemmstoffe wurden sowohl alternative Substrate wie (-)Metaraminol (Berti und Shore, 1967) und (+)Amphetamin (Azzaro et al., 1974), als auch Substanzen verwendet, von denen wir nicht wissen, ob sie als Substrate des Carriers

fungieren, nämlich Cocain (Iversen,1964), Desipramin (Maxwell et al., 1969) und Nomifensin (Schacht und Heptner, 1974).

Der Einfluß von extrazellulärem Na^+ auf die Wirkung der Inhibitoren wurde in zwei verschiedenen Versuchsmodellen getestet. Einerseits wurde die Inhibitorkonstante (K_i) der Substanzen unter Kontrollbedingungen (140 mM Na^+) und bei 25 mM Na^+ bestimmt, und andererseits wurde der Einfluß der Inhibitoren auf die Beziehung zwischen Aufnahmegeschwindigkeit und Na^+-Konzentration (bei einer konstanten Noradrenalin-Konzentration) untersucht. Beide Arten von Versuchen erbrachten die gleichen Ergebnisse (Tabelle 1). Mit Ausnahme von Cocain nahm bei allen untersuchten Inhibitoren der Hemmeffekt auf die neuronale Aufnahme mit fallenden Na^+-Konzentrationen ab. Cocain dagegen war bei niedrigen Na^+-Konzentrationen wirksamer als bei hohen Na^+-Konzentrationen. Die kinetische Analyse der Ergebnisse, die die Aufnahmegeschwindigkeit als Funktion der Na^+-Konzentration beschreibt, zeigt, daß sich außer Cocain alle untersuchten Inhibitoren bezüglich Na^+ als Substrat wie "mixed-type" Inhibitoren verhalten; Cocain war bezüglich Na^+ als Substrat ein kompetitiver Hemmstoff. Diese Beobachtung kontrastiert mit der aus der Literatur bekannten Tatsache, daß alle untersuchten Hemmstoffe bezüglich Noradrenalin als Substrat kompetitive Inhibitoren sind (s. auch Ergebnisse dieser Arbeit).

Sammet und Graefe (1979) haben unter Berücksichtigung ihrer eigenen Ergebnisse und der von Graefe und Fuchs (1979) gemachten Beobachtungen ein Modell für den neuronalen Noradrenalin-Transport vorgeschlagen. Das Reaktionsschema dieses Modells sieht wie folgt aus:

$$C \overset{+Na}{\rightleftharpoons} CNa \overset{+NA}{\rightleftharpoons} CNaNA \overset{\text{Translokation}}{\rightleftharpoons} CNaNA \overset{-NA}{\rightleftharpoons} CNa \overset{-Na}{\rightleftharpoons} C$$

In diesem Schema bedeuten C = Carrier, Na = Na^+ und NA = Noradrenalin. Das Modell zeigt eine geordnete Bi-Substratreaktion, in

Tabelle 1:

K_i-Wert (µM)	140 mM Na^+	25 mM Na^+
Cocain	1,3 (kompetitiv)	0,28 (kompetitiv)
(-)Metaraminol	1,3 (kompetitiv)	5,2 (kompetitiv)
Nomifensin	0,058 (kompetitiv)	0,17 (kompetitiv)
(+)Amphetamin	0,12 (kompetitiv)	0,36 (kompetitiv)
Desipramin	keine Aussage möglich	keine Aussage möglich

Tabelle 1: Vergleich der K_i-Werte verschiedener Hemmstoffe der neuronalen ^3H-Noradrenalin-Aufnahme bei zwei verschiedenen Na^+-Konzentrationen (25 und 140 mM)

der der Carrier zunächst Na^+ bindet und erst danach Noradrenalin. Dieses Modell ist mit allen bisher veröffentlichten Befunden vereinbar. Es gibt keinen Noradrenalin-Transport ohne Na^+, d.h. nur der ternäre Komplex (CNaNA) wird transportiert. Eventuell gebildete binäre Komplexe (CNa oder CNA) sind nicht in der Lage, die Membran zu durchqueren. Die Schlußfolgerung, daß der Komplex CNa gebildet (und nicht transportiert) wird, ergibt sich aus der Beobachtung, daß Na^+-freie Lösungen den Efflux von Noradrenalin aus den sympathischen Nervenendigungen stark beschleunigen (Paton, 1973) und, daß steigende extrazelluläre Na^+-Konzentrationen den Efflux von Noradrenalin zunehmend hemmen (Graefe und Fuchs, 1979); d.h. extrazelluläres Na^+ scheint (in Abwesenheit von extrazellulärem Amin) den Carrier mit hoher Affinität an der Außenseite der Membran festzuhalten (Bildung von CNa), so daß kaum Carrier-Moleküle auf der Innenseite der

Membran für den Amin-Efflux zur Verfügung stehen. Das Modell impliziert, daß der unbesetzte Carrier mobil ist (Sammet und Graefe, 1979) und daß der binäre Komplex CNA nicht gebildet wird. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützen diese Annahme, denn wenn Substrate auch ohne Na^+ an den Carrier gebunden werden (der Carrier-Substrat-Komplex ohne Na^+ aber nicht transportiert wird), dann sollte die Anwesenheit extrazellulären Substrats ((-)Metaraminol, (+)Amphetamin) den Noradrenalin-Efflux in Na^+-freies Medium hemmen. Das wurde in den hier beschriebenen Versuchen nicht beobachtet, denn weder (-)Metaraminol noch (+)Amphetamin hatten einen hemmenden Einfluß auf die Efflux-Steigerung, die durch Na^+-freies Medium hervorgerufen wurde. Die beobachtete initiale Steigerung des Effektes der Na^+-freien Lösung zeigt, daß die extrazelluläre Flüssigkeit nicht von Beginn der Exposition mit Na^+-freier Lösung an Na^+-frei war. Da das Medium in den Efflux-Versuchen in Minuten-Intervallen gewechselt wurde, muß man wohl annehmen, daß es 2 bis 3 min dauert, bis die extrazelluläre Flüssigkeit mit dem Na^+-freien Medium ausgetauscht ist. Geringe Mengen von Na^+ würden aber ausreichen, um eine Aufnahme von (-)Metaraminol oder (+)Amphetamin zu bewerkstelligen, wodurch die Verfügbarkeit von Carriermolekülen auf der Innenseite der Membran zumindest kurzfristig erhöht (und damit der Noradrenalin-Efflux beschleunigt) wird.

Die Efflux-Versuche haben auch zur Klärung einer anderen Frage beigetragen. In den Aufnahmeversuchen waren die Ergebnisse mit Nomifensin und Desipramin qualitativ identisch mit denen, die mit den Substraten (-)Metaraminol und (+)Amphetamin beobachtet wurden: alle Hemmstoffe waren "mixed-type" Inhibitoren bezüglich Na^+ als Substrat. Diese Beobachtung allein würde den Schluß zulassen, daß Nomifensin und Desipramin Substrate des Carriers (d.h. transportierte Inhibitoren) sind. Die Efflux-Versuche zeigen aber deutlich, daß zumindest Nomifensin sich nicht wie ein Substrat verhält, sondern wie Cocain den Efflux in Na^+-freies Medium hemmt. Die Tatsache, daß Nomifensin den Efflux weniger stark beeinträchtigte als Cocain (obwohl beide Inhibitoren in Konzen-

trationen verwendet wurden, die bei Aufnahmeversuchen in 140 mM Na^+ etwa equieffektiv waren), bestätigt die Annahme, daß Nomifensin im Gegensatz zu Cocain Na^+ benötigt, um an den Carrier gebunden zu werden. Der Hemmeffekt von Nomifensin auf den Efflux von Noradrenalin in Na^+-freies Medium ist in den hier beschriebenen Versuchen (Abb. 15) wahrscheinlich überschätzt. Wie bereits diskutiert, ist nämlich die extrazelluläre Flüssigkeit nicht vom Beginn der Inkubation des Gewebes mit Na^+-freier Lösung an Na^+-frei, so daß während der ersten 2-3 min noch genügend Na^+ für die Bindung von Nomifensin an den Carrier zur Verfügung steht.

Unter Berücksichtigung des oben erwähnten Schemas des Noradrenalin-Transports lassen sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wie folgt zusammenfassen. Cocain ist kompetitiv bezüglich Noradrenalin und Na^+ als Substrat; d.h. Cocain bindet sowohl an den freien Carrier (C), als auch an den binären Carrier-Natrium-Komplex. Alle anderen hier untersuchten Inhibitoren (mit Ausnahme von Desipramin bei 140 mM Na^+) sind "mixed-type" Inhibitoren bezüglich Na^+ als Substrat und kompetitiv bezüglich Noradrenalin als Substrat. Sie binden offensichtlich nicht an den freien Carrier, sondern nur an den Carrier-Natrium-Komplex; im Unterschied zu den Substraten ((-)Metaraminol und (+)Amphetamin) werden sie aber nicht (oder nur relativ langsam) transportiert.

Desipramin beeinträchtigte bei 140 mM Na^+ die neuronale Amin-Aufnahme wie ein "mixed-type" Hemmstoff. Diese Ergebnisse, die nicht im Einklang mit der Literatur (Iversen, 1975) stehen, könnten darauf zurück zu führen sein, daß das hier beschriebene Versuchsprotokoll, im Gegensatz zu den bisher in der Literatur beschriebenen Versuchen, eine Vorinkubation des Gewebes mit Desipramin beinhaltete. Für Desipramin als hochpotenten Inhibitor der neuronalen Noradrenalin-Aufnahme darf man davon ausgehen, daß die Anlagerung an den Rezeptor für die neuronale Aufnahme ($uptake_1$; Iversen, 1963) nur sehr langsam verläuft. Bei einer Vorinkubation ist zu erwarten, daß sich

Desipramin an eine größere Anzahl von uptake$_1$-Rezeptoren anlagern kann, und daß es als stark lipophile Substanz (als Psychopharmakon dringt es leicht ins ZNS ein) auch in das sympathische Nervenende eindringt. Dort könnte sich Desipramin mit den an der Membraninnenseite befindlichen Carrier-Molekülen verbinden und sie immobilisieren, d.h. die Aufnahme von Noradrenalin von innen her nicht-kompetitiv hemmen. Die Vorinkubation mit Desipramin könnte sich also so auswirken, daß Desipramin zunächst rein kompetitiv die Amin-Aufnahme nur von außen und später auch von innen, dann aber nicht-kompetitiv hemmt.

Eine ähnliche Wirkungsverstärkung durch Vorinkubation fand Bönisch (persönliche Mitteilungen), der die initiale neuronale Noradrenalin-Aufnahme am perfundierten Kaninchenherzen in Anwesenheit von Nomifensin, Tyramin und Amphetamin bestimmte. Noradrenalin wurde entweder gleichzeitig mit den Substanzen oder erst nach 20-minütiger Vorinkubation mit den Substanzen zugegeben. Die Hemmwirkung von Amphetamin und Tyramin blieb unverändert, wogegen die Wirkung von Nomifensin um den Faktor 100 zunahm. Auch hier könnte die extreme Wirkungszunahme des Hemmeffektes von Nomifensin auf die oben erwähnte "additive" Hemmwirkung zurück zu führen sein. Warum sich Nomifensin in der vorliegenden Arbeit anders verhielt als Desipramin, wird Gegenstand weiterer Forschung sein müssen.

E) ZUSAMMENFASSUNG

1. Ductus deferentes von mit Reserpin vorbehandelten Ratten (Monoaminoxidase und Catechol-O-Methyltransferase gehemmt) wurden in Aufnahmeversuchen zunächst in einer ersten Versuchsreihe mit verschiedenen ^{3}H-Noradrenalin-Konzentrationen (1,0 bis 12,2 µM) bei zwei verschiedenen Na^{+}-Konzentrationen von 140 und 25 mM (115 mM NaCl wurden isosmolar durch TrisHCl ersetzt) inkubiert. In einer zweiten Versuchsreihe betrug die ^{3}H-Noradrenalin-Konzentration konstant 1,18 µM, bei wechselnder Na^{+}-Konzentration (10 bis 140 mM).

2. Die initiale ^{3}H-Noradrenalin-Aufnahme, errechnet aus der Differenz zwischen der Gesamtaufnahme in Abwesenheit und der Aufnahme in Gegenwart von 100 µM Cocain (cocainresistente Aufnahme; Sammet und Graefe, 1979) wurde entweder unter Kontrollbedingungen oder in Gegenwart verschiedener Hemmstoffe der neuronalen Aminaufnahme (Cocain, (-)Metaraminol, (+)Amphetamin, Nomifensin und Desipramin) bestimmt.

3. In Auswaschversuchen wurde der Einfluß der verschiedenen Hemmstoffe auf die Effluxbeschleunigung durch Na^{+}-freie Lösung untersucht.

4. Die cocainresistente Aufnahme von ^{3}H-Noradrenalin war sowohl unabhängig von der verwendeten Na^{+}-Konzentration, als auch unabhängig vom verwendeten Hemmstoff. Ferner war sie immer linear abhängig von der ^{3}H-Noradrenalin-Konzentration im Inkubationsmedium, d.h. die cocainresistente Aufnahme war im gewählten Konzentrationsbereich nicht sättigungsfähig.

5. Die Aufnahmeversuche ermöglichten die Unterteilung der untersuchten Hemmstoffe in drei Untergruppen. Das Cocain verhielt sich sowohl dem Noradrenalin, als auch dem Na^+ als Substrat gegenüber kompetitiv. (-)Metaraminol, (+)Amphetamin und Nomifensin waren in ihrem Verhalten Noradrenalin gegenüber kompetitive Hemmstoffe, Na^+ als Substrat gegenüber aber "mixed-type" Inhibitoren. Desipramin schließlich verhielt sich Noradrenalin gegenüber bei 25 mM Na^+ praktisch kompetitiv, bei 140 mM Na^+ aber wie ein "mixed-type" Inhibitor. Die aufnahmehemmende Wirkung von Desipramin nimmt mit steigender Na^+-Konzentration zu, ohne einem speziellen Hemmtypus zugeordnet werden zu können.

6. In den Efflux-Versuchen wurden die Hemmstoffe bezüglich ihrer Aufnahmehemmung bei 140 mM Na^+ in equieffektiven Konzentrationen verwendet. Es zeigte sich, daß Cocain wirksamer als alle anderen Inhibitoren bei Na^+-freiem Auswaschmedium den Efflux von ^{3}H-Noradrenalin hemmt. Dies ist eine Bestätigung dafür, daß die Hemmwirkung von Cocain auf den neuronalen ^{3}H-Noradrenalin-Transport durch das Fehlen von extrazellulärem Na^+ nicht beeinträchtigt wird. Der Hemmeffekt der anderen Hemmstoffe fällt deutlich geringer aus, d.h. im Gegensatz zu Cocain benötigen sie Na^+, um an den Carrier gebunden zu werden.

7. Die mit dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse unterstützen das von Sammet und Graefe (1979) für den neuronalen Noradrenalin-Aufnahmemechanismus vorgeschlagene Modell einer geordneten, sequentiellen Bi-Substratreaktion zwischen Na^+ und Noradrenalin am Carriersystem, wobei Na^+ als Co-Substrat des Noradrenalins bei dessen neuronaler Aufnahme fungiert.

8. Unter Berücksichtigung dieses Schemas lassen sich die untersuchten Hemmstoffe in zwei Gruppen einteilen: Cocain bindet sowohl an den freien Carrier als auch an den binären Carrier-Na^+-Komplex; alle anderen Hemmstoffe binden nur an den Carrier-Na^+-Komplex, wobei die Substrate transportiert werden.

Herrn Privatdozenten Dr. med. Karl-Heinz GRAEFE möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und seine jederzeit freundliche und geduldige Unterstützung beim Zustandekommen dieser Arbeit danken.

Ebenso gilt mein herzlicher Dank Herrn Professor Dr. med. U. TRENDELENBURG, der mir durch konstruktive Anregungen wertvolle Hilfe bei der Ausarbeitung des Manuskripts gegeben hat.

Die Durchführung der Versuche wäre ohne die Unterstützung von Frau Marianne BABL, der mein besonderer Dank gilt, nicht möglich gewesen.

F) LITERATURVERZEICHNIS

AZZARO, A.J., ZIANCE, R.J., RUTLEDGE, C.O.
The importance of neuronal uptake of amines for amphetamine-induced release of ^{3}H-norepinephrine from isolated brain tissue.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 189, 110-118 (1974).

BERTI, F., SHORE, P.A.
A kinetic analysis of drugs that inhibit the adrenergic neuronal membrane amine pump.
Biochem . Pharmacol. 16, 2091-2094 (1967).

BOGDANSKI, D.F., BRODIE, B.B.
Role of sodium and potassium ions in storage of norepinephrine by synaptic nerve endings.
Life Sci. 5, 1563-1569 (1966).

BOGDANSKI, D.F., BRODIE, B.B.
The effects of inorganic ions on the storage and uptake of ^{3}H-norepinephrine by rat heart slices.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 165, 181-189 (1969).

BOGDANSKI, D.F., TISSARI, A.H., BRODIE, B.B.
Role of sodium, potassium, ouabain, and reserpine in uptake, storage and metabolism of biogenic amines in synpatosomes.
Life Sci. 7, 419-428 (1968).

BOGDANSKI, D.F., TISSARI, A.H., BRODIE, B.B.
Mechanism of transport and storage of biogenic amines. III. Effects of sodium and potassium on kinetics of 5-hydroxytryptamine and norepinephrine transport by rabbit synaptosomes.
Biochim. Biophys. Acta 219, 189-199 (1970).

BURGEN, A.S.V., IVERSEN, L.L.
The inhibition of noradrenaline uptake by sympathomimetic amines in the rat isolated heart.
Br. J. Pharmacol. 25, 34-49 (1965).

GILES, R.E., MILLER, J.W.
A comparison of certain properties of catechol-O-methyl transferase to those of adrenergic beta receptors.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 156, 201-206 (1967).

GRAEFE, K.-H., BÖNISCH, H., KELLER, B.
Saturation kinetics of the adrenergic neurone uptake system in the perfused rabbit heart. A new method of determination of initial rates of amine uptake.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 302, 263-273 (1978).

GRAEFE, K.-H., FUCHS, G.
On the mechanism of neuronal efflux of axoplasmic ^{3}H-(-)noradrenaline.
In: Catecholamines: Basic and clinical frontiers, vol. 1 (E. Usdin, I.J. Kopin, J. Barchas; eds.), pp. 268-270.
New York-Oxford-Toronto-Sydney-Frankfurt-Paris: Pergamon Press 1979.

GRAEFE, K.-H., STEFANO, F.J.E., LANGER, S.Z.
Preferential metabolism of ^{3}H-(-)norepinephrine through the deaminated glycol in the rat vas deferens.
Biochem. Pharmacol. 22, 1147-1160 (1973).

HARRIS, J.E., BALDESSARINI, R.J.
The uptake of ^{3}H-dopamine by homogenates of rat corpus striatum: effects of cations.
Life Sci. 13, 303 - 312 (1973).

HOLZ, R.W., COYLE, J.T.
The effects of various salts, temperature, and the alkaloids veratridine and batrachotoxin on the uptake of ^{3}H-dopamine into synaptosomes from rat stratium.
Mol. Pharmacol. 10, 746 - 758 (1974).

HORN, A.S. Structure-activity relations for the inhibition of catecholamine uptake into synaptosomes from noradrenaline and dopaminergic neurones in rat brain homogenates. Br.J. Pharmacol. 47, 332- 338 (1973).

HORN, A.S., COYLE, J.T., SNYDER, S.H. Catecholamine uptake by synaptosomes from rat brain: structure-actitivy relationships of drugs with differential effects on dopamine and norepinephrine neurons. Mol. Pharmacol. 7, 66-80 (1971).

HORST, W.D., KOPIN, I.J., RAMEY, E.R. Influence of sodium and calcium on norepinephrine uptake by isolated perfused rat hearts. Am. J. Physiol. 215, 817-822 (1968).

IVERSEN, L.L. The uptake of noradrenaline by the isolated perfused rat heart. Br.J. Pharmacol. 21, 523-537 (1963).

IVERSEN, L.L. Inhibition of noradrenaline uptake by sympathomimetic amines. J. Pharm. Pharmacol. 16, 435-436 (1964).

IVERSEN, L.L. The uptake of adrenaline by the rat isolated heart. Br. J. Pharmacol. 24, 387-394 (1965).

IVERSEN, L.L. The uptake and storage of noradrenaline in sympathetic nerves. Cambridge: Cambridge Univ. Press 1967.

IVERSEN, L.L. Uptake mechanisms for biogenic amines. In: Handbook of Psychopharmacology (L.L. Iversen, S.D. Iversen and S.H. Snyder; eds.), vol. 3, pp. 381-442. New York-London: Plenum Press 1975.

IVERSEN, L.L., KRAVITZ, E.A. Sodium dependence of transmitter uptake at adrenergic nerve terminals. Mol. Pharmacol. 2, 360-362 (1966).

IVERSEN, L. L., MACKAY, A. V. P. — Pharmacodynamics of antidepressants and antimanic drugs. In: Psychopharmacology of affective disorders (E. S. Paykel and A. Coppen, eds.), pp. 60-90. Oxford-New York-Toronto: Oxford University Press 1979.

IVERSEN, L. L., SALT, P. J. — Inhibition of catecholamine uptake $_2$ by steroids in the isolated rat heart. Br. J. Pharmacol. 40, 528-530 (1970).

KELLER, B., GRAEFE, K. -H. — The inhibitory effect of some monovalent cations on the stimulation by Na^+ of the neuronal uptake of noradrenaline. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 309, 89-97 (1979).

LINDMAR, R., LÖFFELHOLZ, K. — Neuronal and extraneuronal uptake and efflux of catecholamines in the isolated rabbit heart. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 284, 63-92 (1974).

LINEWEAVER, W., BURK, D. — The determination of enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. Soc., 56, 658-666 (1934).

MAXWELL, R. A., CHAPLIN, E., ECKHARDT, S. B., SOARES, J. R., HITE, G. — Conformational similarities between molecular models of phenethylamine and of potent inhibitors of the uptake of tritiated norepinephrine by adrenergic nerves in rabbit aorta. J. Pharmacol. Exp. Ther. 173, 158-165 (1970).

MAXWELL, R. A., KEENAN, P. D., CHAPLIN, E., ROTH, B., ECKHARDT, S. B. — Molecular features affecting the potency of tricyclic antidepressants and structurally related compounds as inhibitors of the uptake of tritiated norepinephrine by rabbit aortic strips. J. Pharmacol. Exp. Ther. 166, 320 - 329 (1969).

MAXWELL, R.A., WHITE, H.L. — Tricyclic and monoamine oxidase inhibitor antidepressants: structure-activity relationships. In: Handbook of Psychopharmacology (L.L. Iversen, S.D. Iversen and S.H. Snyder; eds.), vol. 14, pp. 83-155. New York-London: Plenum Press 1978.

MUSCHOLL, E. — Effect of cocaine and related drugs on the uptake of noradrenaline by heart and spleen. Br.J. Pharmacol. 16, 352-359 (1961).

MUSCHOLL, E., WEBER, E. — Die Hemmung der Aufnahme von α-Methylnoradrenalin in das Herz durch sympathomimetische Amine. Nauny-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 252, 134-143 (1965).

PATON, D.M. — Mechanism of efflux of noradrenaline from adrenergic nerves in rabbit atria. B.J. Pharmacol. 49, 614-627 (1973).

ROSS, S.B., KELDER, D. — Release of ^{3}H-noradrenaline from the rat vas deferens under various in vitro conditions. Acta physiol. scand. 105, 338-349 (1979).

SAMMET, S., GRAEFE, K.-H. — Kinetic analysis of the interaction between noradrenaline and Na^{+} in neuronal uptake: kinetic evidence for co-transport. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 309, 99 - 107 (1979).

SÁNCHEZ-ARMÁSS, S., ORREGO, F. — A major role for chloride in ^{3}H-noradrenaline transport by rat heart adrenergic nerves. Life Sci. 20, 1829-1838 (1977).

SÁNCHEZ, ARMÁSS, S., ORREGO, F. — Noradrenaline transport by rat heart sympathetic nerves: a re-examination of the role of sodium ions. Nauny-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 302, 255-261 (1978).

SCHACHT, U., HEPTNER, W.
Effect of nomifensine (HOE 984), a new antidepressant, on uptake of noradrenaline and serotonin and on release of noradrenaline in rat brain synaptosomes.
Biochem. Pharmacol. 23, 3413-3422 (1974).

SEGEL, I.H.
Enzyme kinetics. Behaviour and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems.
New York-London-Sydney-Toronto: John Wiley & Sons 1975.

SNEDECOR, G.W., COCHRAN, W.G.
Statistical Methods (6th ed.).
Ames: Iowa State University Press 1967.

SUGRUE, M.F., SHORE, P.A.
The mode of sodium dependency of the adrenergic neuron amine carrier. Evidence for a second, sodium-dependent, optically specific and reserpine-sensitive system.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 170, 239-245 (1969).

WHITE, T.D.
Models of neuronal noradrenaline uptake.
In: The mechanism of neuronal and extraneuronal transport of catecholamines (D.M. Paton, ed.), pp. 175-193.
New York: Raven Press 1976.

WHITE, T.D., PATON, D.M.
Effects of external Na^+ and K^+ on the initial rates of noradrenaline uptake by synaptosomes prepared from rat brain.
Biochim. Biophys. Acta 266, 116-127 (1972).

ZIEHER, L.M., JAIM-ETCHEVERRY, G.
Regional variations in the distribution of noradrenaline along the rat vas deferens.
J. Pharm. Pharmacol. 23, 61-63 (1971).

LEBENSLAUF

Am 5. Juli 1956 wurde ich, Claus-Jürgen Hans Zeitner, als zweites Kind des Polizeibeamten Robert Zeitner und seiner Ehefrau Anna-Maria, geb. Müller, in Miltenberg geboren.

Von 1962 bis 1965 besuchte ich in Miltenberg die Evangelische Volksschule, daran anschließend bis zum Abitur im Jahre 1975 den mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig des Johannes-Butzbach-Gymnasiums. Im Wintersemester 1975/76 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität in Würzburg, wo ich im August 1977 die Ärztliche Vorprüfung und am 4. November 1981 die Ärztliche Prüfung bestand.

Seit Dezember 1981 bin ich als Stabsarzt im Bundeswehr-Krankenhaus in München tätig.

Claus-Jürgen Zeitner

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80